



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 916**

51 Int. Cl.:
A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05786318 .5**

96 Fecha de presentación : **15.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1755567**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Producto para suministro de fármaco y métodos.**

30 Prioridad: **16.06.2004 US 869693**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es: **University of Massachusetts
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110, US**

72 Inventor/es: **Ostroff, Gary, R.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 916 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producto para suministro de fármaco y métodos.

5 **Antecedentes de la invención**

Los sistemas de suministro de fármaco están diseñados para proporcionar un reservorio biocompatible de un agente activo para la liberación controlada del agente activo dependiente de ya sea el tiempo, o las condiciones locales, tales como pH. Mientras los sistemas macroscópicos de suministro de fármaco tales como parches transdermales, bombas osmóticas implantables y depósitos subcutáneos implantables (por ejemplo, NOR-PLANT™) han tenido algún éxito, ha habido interés continuo en sistemas macroscópicos de suministro de fármaco tales como microcápsulas, micropartículas y liposomas.

Las microcápsulas y microesferas son usualmente polvos que consisten de partículas esféricas de 2 milímetros o menos de diámetro, usualmente 500 micrones o menos de diámetro. Si las partículas son menos de 1 micrón, son a menudo referidas como nanocápsulas o nanoesferas. Una descripción de métodos para hacer y usar microesferas y microcápsulas se puede encontrar, por ejemplo en la Patente Estadounidense No. 5,407,609. Las microcápsulas y microesferas se pueden distinguir de entre sí por si el agente activo se forma en un núcleo central rodeado por una estructura encapsulante, tal como una membrana polimérica, o si el agente activo es dispersado a través de la partícula; esto es, la estructura interna es una matriz del agente y excipiente, usualmente un excipiente polimérico. La liberación del agente activo de una microcápsula es a menudo regulada por la biodegradación del material de matriz, usualmente un material polimérico biodegradable tal como ya sea poli(DL-láctido) (DL-PL) o poli(DL-láctido-co-glicólido) (DL-PLG) como el excipiente polimérico.

Las liposomas pueden ser consideradas microcápsulas en las cuales el núcleo de agente activo es abarcado por una membrana líquida en lugar de una membrana polimérica. Las liposomas son vesículas lipídicas artificiales que consisten de capas lipídicas, en donde el antígeno puede ser encapsulado dentro del compartimiento acuoso de la liposoma, o asociado con el antígeno en la superficie vía técnicas de acoplamiento de superficie. Las liposomas pueden ser preparadas fácilmente y económicamente a gran escala y bajo condiciones que son medias para atrapar antígenos. No inducen respuestas inmunes a los mismos, y son usadas en humanos para fármacos parenteralmente administrados.

Mientras la relación de volumen/área de superficie alta de microcápsulas, las microesferas y liposomas favorecen la liberación del agente activo, su menor tamaño proporciona retos en la manufacturación. Una amplia variedad de métodos para preparar las microcápsulas y microesferas se describen en la literatura, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,407,609. Varios de estos métodos hacen uso de emulsiones para hacer microesferas, en particular para hacer microesferas de menos de 2 milímetros de diámetro. Para dar un ejemplo general de tales procesos, se puede disolver un polímero en un solvente orgánico adecuado (el solvente polímero), disolver o dispersar un agente en esta solución polimérica, dispersar la mezcla de agente/polímero resultante en una fase acuosa (el medio de procesamiento) para obtener una emulsión aceite-en-agua con microgotitas de aceite dispersadas en el medio de procesamiento, y remover el solvente de las microgotitas para formar microesferas. Estos procesos pueden también ser realizados con emulsiones agua-en-aceite y con emulsiones dobles. El uso de procesos a base de emulsión que sigue este procedimiento básico se describe en varias patentes Estadounidenses, tales como las Patentes Estadounidenses Nos. 3,737,337, 3,891,570, 4,384,975, 4,389,330, y 4,652,441.

Alternativamente, partículas de la pared celular de levadura extraída son partículas sustancialmente esféricas, biodegradables, fácilmente disponibles de aproximadamente 2-4 Pm de diámetro. La preparación de partículas de la pared celular de levadura extraída se conoce en la técnica, y se describe, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses No. 4,992,540, 5,082,936, 5,028,703, 5,032,401, 5,322,841, 5,401,727, 5,504,079, 5,968,811, 6,444,448 B1, 6,476,003 B1, solicitudes Estadounidenses publicadas 2003/0216346 A1, 2004/0014715 A1, y solicitud PCT publicada WO 02/12348 A2. Una forma de partículas de la pared celular de levadura extraída, referida como "partículas de glucano enteras", han sido sugeridas como vehículos de suministro, pero han sido limitadas ya sea para liberación por difusión simple del ingrediente activo a partir de la partícula o liberación de un agente químicamente reticulado a la partícula de glucano entera por biodegradación de la matriz de partícula. Véase Patentes Estadounidenses Nos. 5,032,401 y 5,607,677.

El documento WO2004037232 describe un producto encapsulado que comprende una pluralidad de micro-cápsulas formadas a partir de una pluralidad de micro-organismos y que tienen un activo lipofílico encapsulado y pasivamente retenido dentro de las micro-cápsulas, el activo lipofílico no es un constituyente natural de los micro-organismos, las micro-cápsulas tienen: (a) una pared celular al menos sustancialmente intacta; y (b) una membrana celular intacta; en donde las micro-cápsulas son formuladas para dirigir el suministro de las micro-cápsulas y el activo lipofílico a una membrana mucosa al menos deseada.

Las partículas de la pared celular de levadura extraída, principalmente debido a su contenido beta-glucano, son dirigidas a células fagocíticas, tales como macrófagos y células de tejido linfóide. El tejido linfóide asociado mucosal (MALT) comprende todas las células linfoides en epitelio y en la lámina propia puesta por debajo de las superficies mucosales del cuerpo. Los sitios principales de tejido linfóide asociado mucosal son los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), y los tejidos linfoides asociados bronquiales (BALT).

Otro componente importante del sistema inmune del GI es la célula micro pliegue o M. Las células M son un tipo de células específicas en el epitelio intestinal sobre folículos linfoides que provocan endocitosis de una variedad de proteínas y antígenos peptídicos. En lugar de digerir estas proteínas, las células M las transportan en el tejido subyacente, en donde son tomadas por células dendríticas locales y macrófagos.

5

Las células M toman moléculas y partículas del lumen intestinal por endocitosis o fagocitosis. Este material es entonces transportado a través del interior de la célula en vesículas a la membrana de células basales, en donde se liberan en el espacio extracelular. Este proceso es conocido como transcitosis. En su superficie basal, la membrana celular de células M es extensivamente plegada alrededor de los linfocitos subyacentes y células que presentan antígenos, los cuales toman el material transportado liberado de las células M y lo procesan para presentación del antígeno.

10

Un estudio ha mostrado que la transcitosis de partículas de levadura (3.4 +/- 0.8 micrones de diámetro) por células M de los parches de Peyer toma menos de 1 hora (Beier, R., & Gebert, A., Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches, *Am J Physiol.* 1998 Jul; 275(1 Pt 1):G130-7). Sin fagocitosis significativa por macrófagos intraepiteliales, las partículas de levadura migran hacia abajo en y a través de la lámina basal dentro de 2.5-4 horas, en donde rápidamente consiguen ser fagocitosados y transportados de las cúpulas de parche de Peyer. Las células M encontradas en tejido linfoide nasofaríngeo humano (tonsiles y adenoides) han sido mostradas por estar involucradas en el muestreo de virus que causan infecciones respiratorias. Estudios de un modelo de células M *in vitro* han mostrado la absorción de microesferas fluorescentemente etiquetadas (Fluoesferas, 0.2 Pm) y micropartículas de quitosán (0.2 Pm) van der Lubben I.M., *et al.*, Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model, *J Drug Target*, 2002 Sep; 10(6): 449-56. Una lectina, Ulex europaeus aglutinina 1 (UEA1, específica para residuos alfa-L-fucosa) ha sido usada para dirigir ya sea microesferas de poliestireno (0.5 Pm) o liposomas polimerizadas a células M (0.2 Pm) (Clark, M.A., *et al.*, Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells, *Vaccine.* 2001 Oct 12; 20(1-2): 208-17). En estudios *in vivo* en ratones se ha reportado que microesferas de ácido poli-D,L-láctico (PDLLA) o microesferas de gelatina (GM) pueden ser eficientemente tomadas por macrófagos y células M. (Nakase, H., *et al.*, Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: new approach for treatment of inflammatory bowel disease, *J Gastroenterol.* 2003 Mar; 38 Suppl 15: 59-62).

15

20

25

Sin embargo, se ha reportado que la absorción de vehículos de suministro de partícula sintéticos que incluyen macropartículas de poli(DL-láctido-co-glicólido) y liposomas es altamente variable, y se determina por las propiedades físicas de tanto partículas como células M. Clark, M.A., *et al.*, Exploiting M cells for drug and vaccine delivery, *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Aug 23; 50 (1-2):81-106. El mismo estudio reportó que el suministro puede ser mejorado recubriendo las partículas o liposomas con reactivos que incluyen lectinas apropiadas, adhesinas microbianas e inmunoglobulinas las cuales se unen selectivamente a superficies de células M. Véase también, Florence, A.T., The oral absorption of micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual, *Pharm Res.* 1997 Mar; 14(3): 259-66.

30

35

Receptores de reconocimiento de patrón de patógeno (PRRs) reconocen porciones moleculares y estructurales comunes en superficies microbianas y contribuyen a la inducción de respuestas inmunes innatas. Los receptores de manosa y receptores de beta-glucano en parte participan en el reconocimiento de patógenos fúngicos. El receptor de manosa (MR), un receptor de enlace al carbohidrato expresado en subseries de macrófagos, se considera uno de tales PRR. Los macrófagos tienen receptores para tanto manosa como manosa-6-fosfato que puede unirse a, e internalizar moléculas que despliegan estos azúcares. Las moléculas son internalizadas por endocitosis en un endosoma pre-lisosomal. Esta internalización ha sido usada para mejorar la entrada de oligonucleótidos en macrófagos usando albúmina de suero bovino modificada con manosa-6-fosfato y ligada a un oligodesoxinucleótido por un puente disulfuro a un extremo 3' modificado; véase Bonfils, E., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 1992 20, 4621-4629. véase E. Bonfils, C. Mendes, A. C. Roche, M. Monsigny and P. Midoux, *Bioconj. Chem.*, 3, 277-284 (1992). Los macrófagos también expresan receptores de beta-glucano, que incluyen CR3 (Ross, G.D., J.A. Cain, B.L. Myones, S.L. Newman, and P.J. Lachmann. 1987. Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for β -glucans. *Complement Inflamm.* 4:61), dectina-1. (Brown, G.D. and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature* 413:36.), y lactosilceramida (Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. A novel carbohydrate-glycosphinglipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21; 273(34): 22014-20.). El receptor de beta-glucano, CR3 es predominantemente expresado en monocitos, neutrófilos y células NK, mientras la dectina-1 es predominantemente expresada en la superficie de las células de los macrófagos. La lactosilceramida se encuentra en niveles elevados en células M. La microglía también puede expresar un receptor de beta-glucano (Muller, C.D., *et al.* Functional beta-glucan receptor expression by a microglial cell line, *Res Immunol.* 1994 May; 145(4): 267-75).

40

45

50

55

Existe evidencia de efectos aditivos en fagocitosis de enlace a tanto manosa como receptores de beta-glucano. Giaimis *et al.* reporta observaciones que sugieren que la fagocitosis de levadura elimina el calor no opsonizada (*S. cerevisiae*) por líneas de células similares a macrófago murino así como también macrófagos residentes peritoneales murinos es mediada por tanto manosa como receptores de beta-glucano. Para lograr fagocitosis máxima de levadura eliminada por calor no opsonizada, se requiere la coexpresión de tanto manosa como receptores de beta-glucano (Giaimis, J., *et al.*, Both mannose and beta-glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages, *J Leukoc Biol.* 1993 Dec; 54(6): 564-71).

60

65

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano y una molécula de captura de carga útil como se reivindica en la reivindicación 1. El sistema de suministro de partícula opcionalmente, pero típicamente, también incluye una molécula de carga útil, en donde la molécula de carga útil y la molécula de captura de carga útil son solubles en el mismo sistema solvente. En modalidades preferidas, el sistema solvente comprende agua. En otras modalidades preferidas, el sistema solvente consiste esencialmente de agua. El sistema de suministro de partícula de la presente invención es útil para suministro tanto *in vivo* como *in vitro* de moléculas de carga útil a las células.

La pared de célula de levadura extraída comprende menos de 90 por ciento en peso de beta-glucano. En ciertas modalidades preferidas, la pared celular de levadura extraída comprende más de 50 por ciento en peso de quitina. En otras modalidades preferidas, la pared celular de levadura extraída además comprende más de 30 por ciento en peso de manano. En ciertas modalidades, la pared celular de levadura extraída incluye más de 1 por ciento en peso de proteína.

En modalidades preferidas, la molécula de carga útil se selecciona del grupo que consiste de un polinucleótido, un péptido, una proteína, un agente activo orgánico pequeño, un agente activo inorgánico pequeño y una mezcla de los mismos. En ciertas modalidades preferidas, la molécula de carga útil es un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste de un oligonucleótido, un constructo antisentido, un siRNA, un ARN enzimático, un constructo de ADN enzimático, un vector de expresión, y una mezcla de los mismos. En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención es útil para suministro *in vivo* o *in vitro* de moléculas de carga útil tales como aminoácidos, péptidos y proteínas. Los péptidos pueden ser moléculas de señalización tales como hormonas, neurotransmisores o neuromoduladores, y pueden ser los fragmentos activos de moléculas más grandes, tales como receptores, enzimas o proteínas de enlace al ácido nucleico. Las proteínas pueden ser enzimas, proteínas estructurales, proteínas de señalización o proteínas de enlace al ácido nucleico, tales como factores de transcripción.

En otras modalidades preferidas, la molécula de carga útil es un agente activo orgánico pequeño, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. En modalidades particularmente preferidas, el agente activo orgánico pequeño es un oligómero de enlace al ADN específico de la secuencia, más preferiblemente un oligómero de poliamidas heterocíclicas que se unen a la ranura menor del ADN de doble hebra, tal como aquellas descritas en la Patente Estadounidense No. 6.506,906 y en Dervan, P. Molecular Recognition of DNA by Small Molecules, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2001) 9: 2215-2235, las cuales están por este medio incorporadas por referencia. En modalidades preferidas, el oligómero tiene subunidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste de N-metilimidazol carboxamida, N-metilpirrol carboxamida, beta-alanina y dimetilaminopropilamida.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención incluye agentes activos inorgánicos, por ejemplo, agentes terapéuticos gastrointestinales tales como hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de sodio y similares.

La elección de la molécula de captura de carga útil puede conferir características específicas al sistema de suministro de partícula. En general, la molécula de captura de carga útil preferida es biocompatible y farmacéuticamente aceptable. Como se notó anteriormente, la molécula de carga útil y la molécula de captura de carga útil son solubles en el mismo sistema solvente. Las moléculas de captura de carga útil adecuadas incluyen polímeros naturales y sintéticos. En ciertas modalidades, las características físicas de la molécula de captura de carga útil, tales como agarosa o poliacrilamida, proporcionan ventajas útiles.

Los polímeros adecuados incluyen polisacáridos. En modalidades preferidas, el polisacárido seleccionado es del grupo que consiste de agarosa, un alginato, un xantano, un dextrano, un quitosán, una goma de galactomanano, un derivado del mismo y una mezcla de los mismos. En ciertas modalidades preferidas, el polisacárido ha sido derivatizado para producir características catiónicas o aniónicas a pH fisiológica.

En otras modalidades, la molécula de captura de carga útil es una molécula cargada a pH fisiológica, tal como un polímero catiónico, un polímero aniónico, un detergente catiónico, un detergente aniónico y una mezcla de los mismos. Polímeros catiónicos preferidos incluyen quitosán, poli-L-lisina y polietileniminas (PEIs), que incluyen polietileniminas sustancialmente lineales, tales como JetPEI, un reactivo de transfección de polímero catiónico de polietilenimina lineal comercialmente disponible (Qbiogene, Inc., CA). Otros reactivos de transfección de polímero catiónico son también adecuados, preferiblemente CytoPure™, un reactivo de transfección de polímero catiónico soluble en agua, comercialmente disponible, propietario (Qbiogene, Inc., CA). En otras modalidades preferidas, polímeros aniónicos adecuados incluyen alginatos, dextranos y xantanos, que incluyen alginatos, dextranos y xantanos derivatizados. En modalidades preferidas adicionales, la molécula de captura de carga útil es un detergente catiónico tal como hexadeciltrimetilamonibromuro. En una modalidad preferida, se usa una mezcla de un detergente catiónico, tal como hexadeciltrimetilamonibromuro, y un polímero catiónico, tal como una polietilenimina. En otra modalidad preferida, se puede usar una mezcla de un detergente catiónico, tal como hexadeciltrimetilamonibromuro, y un polímero catiónico, tal como quitosán o PEI.

Mientras no se ligue a una hipótesis única, se cree que, además de facilitar la retención de la carga útil por las partículas de pared celular de levadura, una molécula de captura de carga útil preferida sirve para estimular la liberación

ES 2 355 916 T3

de la molécula de carga útil del endosoma de una célula fagocítica actuando como un detergente, ayudando a hinchar el endosoma osmóticamente, o por otros efectos.

5 En otras modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos para usar el sistema de suministro de partícula. En ciertas modalidades preferidas, la invención proporciona métodos para suministrar una molécula de carga útil a una célula que comprende las etapas de proporcionar a la pared de célula de levadura extraída que comprende beta-glucano, la pared celular de levadura que define un espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de carga útil en donde la molécula de carga útil llega a ser al menos parcialmente encerrada dentro del espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de captura de carga útil en donde la molécula de captura de carga útil al menos parcialmente confina la molécula de carga útil dentro de la pared celular de levadura extraída para formar un sistema de suministro de partícula; y poner en contacto una célula con el sistema de suministro de partícula. Preferiblemente el método además incluye la etapa de internalizar el sistema de suministro de partícula por la célula.

15 En otras modalidades preferidas, la invención proporciona métodos para elaborar un sistema de suministro de partícula que comprende las etapas de proporcionar a la pared de célula de levadura extraída que comprende beta-glucano, la pared celular de levadura que define un espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de carga útil en donde la molécula de carga útil llega a ser asociada con la pared celular de levadura extraída; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de captura de carga útil en donde la molécula de captura de carga útil estabiliza la asociación de la molécula de carga útil con la pared celular de levadura extraída para formar un sistema de suministro de partícula. En modalidades preferidas, el método también incluye las etapas de lavar y secar el sistema de suministro de partícula.

25 En otras modalidades preferidas, la presente invención proporciona métodos para exponer un individuo a un antígeno que comprende la etapa de poner en contacto una célula fagocítica del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y molécula de carga útil, en donde la molécula de carga útil es un polinucleótido que comprende un elemento de control operativamente ligado a una estructura lectora abierta que codifica un péptido que puede ser controlablemente expresado en las células del individuo. Preferiblemente el péptido codificado es un péptido antigénico. En modalidades preferidas adicionales, la presente invención proporciona métodos para exponer un individuo a un antígeno que comprende la etapa de poner en contacto una célula fagocítica del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y molécula de carga útil, en donde la molécula de carga útil es una molécula antigénica. Una molécula antigénica preferida es un toxoide.

35 En modalidades preferidas, las células puestas en contacto son macrófagos, y pueden también incluir cualquier célula capaz de fagocitosis de partícula de levadura, que incluye células M de los parches de Peyer, monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer, fagocitos alveolares, macrófagos peritoneales, macrófagos lácteos, microglía, eosinófilos, granulocitos, fagocitos mesengiales, células sinoviales A y otros fagocitos. En modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula se administra oralmente y absorbe vía células M de los parches de Peyer en el intestino.

45 En modalidades preferidas el polinucleótido es un constructo de ADN recombinante que comprende un elemento de control operativamente ligado a una estructura lectora abierta que codifica una proteína, por ejemplo, un vector de expresión. La proteína puede ser una proteína estructural, una proteína que tiene actividad enzimática, una proteína de membrana, una proteína de enlace a ADN o una proteína de señalización. En ciertas modalidades preferidas, la proteína es una proteína antigénica.

50 En ciertas modalidades preferidas, el método además incluye la etapa de la célula que expresa la proteína. La proteína expresada puede ser retenida intracelularmente por la célula, incorporada en una estructura membranosa, tal como la membrana plasmática, o ser secretada por la célula.

55 En otras modalidades, más de un tipo de polinucleótido se encierra dentro del sistema de suministro de partícula. En modalidades preferidas, los polinucleótidos proporcionan la capacidad para expresar múltiples productos de gen bajo control. En ciertas modalidades, al menos un producto de gen que se puede expresar es una proteína de membrana, preferiblemente un receptor de membrana, más preferiblemente un receptor unido a la membrana para una molécula de señalización. En algunas modalidades, al menos un producto de gen que se puede expresar es una proteína soluble, preferiblemente una proteína secretada, más preferiblemente una proteína de señalización o péptido.

60 En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para suministrar un fármaco a una célula de macrófago que incluye las etapas de proporcionar una pared de célula de levadura extraída sustancialmente esférica que comprende beta-glucano, la pared celular de levadura que define un espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con un fármaco en donde el fármaco es al menos parcialmente encerrado dentro del espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de captura en donde la molécula de captura es al menos parcialmente encerrada dentro del espacio interno para formar un sistema de suministro de fármaco de partícula; y poner en contacto una célula de macrófago con el sistema de suministro de fármaco de partícula. Preferiblemente, el método también incluye la etapa de internalizar el sistema de suministro de fármaco de partícula por el macrófago. En modalidades preferidas, el método también incluye la etapa de transportar el sistema de suministro

tro de fármaco de partícula por el macrófago. En modalidades particularmente preferidas, el macrófago proporciona el sistema de suministro de fármaco de partícula a un sitio de captura de macrófago, tal como un sitio de infección, reacción inflamatoria, hipoxia o hiperplasia. En ciertas modalidades preferidas, el macrófago proporciona el sistema de suministro de fármaco de partícula a un tumor. En modalidades particularmente preferidas, el método incluye la
5 etapa de liberar el fármaco del sistema de suministro de fármaco de partícula, más preferiblemente además que incluye la etapa de liberar el fármaco en el espacio extracelular. En ciertas modalidades, la etapa de liberar el fármaco incluye las etapas de expresar una proteína recombinante y secretar la proteína en el espacio extracelular.

La presente invención proporciona un método para inmunizar un individuo contra un patógeno. El método com-
10 prende la etapa de poner en contacto células del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y una composición de ácido nucleico, con ello administrando a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica un péptido el cual comprende al menos un epítipo idéntico a, o sustancialmente similar a un epítipo desplegado en el patógeno como antígeno, la secuencia de nucleótido es operativamente ligada a
15 secuencias reguladoras, en donde la molécula de ácido nucleico es capaz de ser expresada en las células del individuo.

En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona un método para producir inmunidad a un toxoide que comprende las etapas de proporcionar un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y un toxoide, poner en contac-
20 to una célula fagocítica con el sistema de suministro de partícula e inducir fagocitosis del sistema de suministro de partícula. La célula fagocítica puede ser una o más de macrófagos, células M de los parches de Peyer, monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer, fagocitos alveolares, macrófagos peritoneales, macrófagos lácteos, microglía, eosinófilos, granulocitos, fagocitos mesengiales, y células sinoviales A.

La presente invención proporciona métodos para inmunizar un individuo contra una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad autoinmune. Los métodos comprenden la etapa de poner en contacto células del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil la cual incluye una composición de ácido nucleico, con ello administrando a
25 las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica un péptido el cual comprende al menos un epítipo idéntico a, o sustancialmente similar a un epítipo desplegado en una proteína asociada a la enfermedad hiperproliferativa o una proteína asociada a la enfermedad autoinmune, respectivamente, y está operativamente ligada a secuencias reguladoras, en donde la molécula de ácido nucleico es capaz de ser expresada en las células del individuo.

La presente invención también proporciona métodos para tratar un individuo que sufre de una enfermedad auto-
35 inmune que comprende las etapas de poner en contacto las células del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil la cual incluye una composición de ácido nucleico, con ello administrando a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que restaura la actividad de un gen ausente, defectivo o
40 inhibido, o que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo, y está operativamente ligada a secuencias reguladoras; la molécula de ácido nucleico es capaz de ser expresada en las células.

En modalidades adicionales, la presente invención proporciona un método para inmunizar un individuo contra una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de poner en contacto células del individuo con un sistema de
45 suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y una molécula de carga útil que es un polinucleótido que comprende una secuencia de control operativamente ligada a una estructura lectora abierta que codifica un péptido que comprende un epítipo idéntico a, o sustancialmente similar a, un epítipo desplegado en una proteína asociada a la enfermedad hiperproliferativa, en donde el péptido codificado es capaz de ser expresado en las células del individuo. En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar un individuo que sufre de una enfermedad genética que comprende la
50 etapa de poner en contacto células del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil y una molécula de carga útil que es un polinucleótido con ello administrando a las células un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que restaura la actividad de un gen ausente, defectivo o inhibido. Preferiblemente, el polinucleótido
55 comprende una secuencia reguladora operativamente ligada a una estructura lectora abierta que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo, la proteína es capaz de ser expresada en las células.

La presente invención también se refiere a métodos para tratar un individuo que sufre de una enfermedad auto-
60 inmune que comprende las etapas de poner en contacto las células del individuo con un sistema de suministro de partícula que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de captura de carga útil la cual incluye una composición de ácido nucleico, con ello administrando a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que restaura la función de un gen ausente, defectivo o inhibido, o que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo, y está operativamente ligada a secuencias reguladoras; la molécula de ácido nucleico es capaz de ser expresada en las células.

65 Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones y métodos los cuales profilácticamente y/o terapéuticamente inmunizan un individuo contra un patógeno o célula relacionada con la enfermedad, anormal. El material genético codifica un péptido o proteína que porta al menos un epítipo con una proteína inmunogénica encon-

trada en el patógeno o células a ser dirigidas. El material genético es expresado por las células del individuo y sirve como un objetivo inmunogénico contra el cual se provoca una respuesta inmune. La respuesta inmune resultante se basa ampliamente: en adición a una respuesta inmune humoral, ambas ramas de la respuesta inmune celular son provocadas. Los métodos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad terapéutica y profiláctica. De este modo, un método para inmunización incluye ambos métodos para proteger un individuo de estimulación de patógeno, o incidencia o proliferación de células específicas, así como también métodos para tratar un individuo que sufre de infección por patógeno, enfermedad hiperproliferativa o enfermedad autoinmune. De este modo, la presente invención es útil para estimular respuestas inmunes amplias contra una proteína objetivo, es decir, proteínas específicamente asociadas con patógenos o las células “anormales” propias del individuo.

La presente invención es también útil para combatir enfermedades hiperproliferativas y trastornos tales como cáncer, estimulando una respuesta inmune contra una proteína objetivo que está específicamente asociada con las células hiperproliferativas. La presente invención además es útil en combatir trastornos y enfermedades autoinmunes estimulando una respuesta inmune contra una proteína objetivo que está específicamente asociada con células involucradas en la condición inmune.

La presente invención también proporciona kits farmacéuticos que comprenden un contenedor que comprende una molécula de carga útil seleccionada del grupo que consiste de una composición de ácido nucleico, composición de proteína, molécula orgánica pequeña y mezclas de los mismos, y un contenedor que comprende una partícula de pared celular de levadura y una molécula de captura. Opcionalmente, se incluyen en tales kits excipientes, portadores, preservativos y vehículos del tipo descrito anteriormente con respecto a composiciones farmacéuticas. El término kit farmacéutico también está propuesto para incluir inoculantes múltiples usados en los métodos de la presente invención. Tales kits incluyen contenedores separados que comprenden diferentes inoculantes y porciones de transferencia. Los kits farmacéuticos de conformidad con la presente invención están también contemplados para incluir una serie de inoculantes usados en los métodos de tratamiento e inmunización y/o métodos terapéuticos, como se describe anteriormente.

Las composiciones y métodos de la presente invención son útiles en los campos de tanto medicina humana como veterinaria. Por consiguiente, la presente invención se refiere a tratamiento terapéutico e inmunización genética de mamíferos, aves y peces. Los métodos de la presente invención pueden ser particularmente útiles para tratamiento terapéutico e inmunización genética de especies de mamífero que incluyen especies de humano, bovino, ovino, porcino, equino, canino y felino.

Lo mencionado anteriormente y otras características y ventajas del sistema de suministro de fármaco de partícula y métodos serán aparentes a partir de la siguiente descripción más particular de las modalidades preferidas del sistema y método como se ilustra en los dibujos acompañantes en los cuales caracteres de referencia similares se refiere a las mismas partes a través de las diferentes vistas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama esquemático 100 de una sección transversal de una pared celular de levadura, que muestra, desde afuera hacia dentro, una capa fibrilar externa 110, una capa de manoproteína externa 120, una capa de beta glucano 130, una capa de beta glucano-quitina 140, una capa de manoproteína interna 150, la membrana plasmática 160 y el citoplasma.

La Figura 2A es un diagrama de la estructura de una partícula de pared celular de levadura; la Figura 2B es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color que muestra el teñido del componente manano de partículas de pared celular de levadura por concanavalina-A-FITC (con-A-isocianato de fluoresceína, Sigma Chemical, St. Louis, MO) que muestra partículas de la pared celular de levadura teñidas sustancialmente de manera completa 210; la Figura 2C es un diagrama de la estructura de una partícula beta glucano-manano YGMP, la Figura 2D es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color que muestra teñido desigual con-A-FITC de una partícula beta glucano-manano YGMP 220; la Figura 2E es un diagrama de la estructura de una partícula beta glucano YGP y la Figura 2F es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una micrografía fluorescente a color que muestra la ausencia de teñido con-A-FITC.

La Figura 3A es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía de luz a color de células expuestas a partículas YGP cargadas con plásmido pIRES etiquetada fluorescente con PEI como el polímero de captura catiónico y CTAB como un detergente catiónico, indicando una célula 310 y la Figura 3B es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra teñido brillante que representa partículas YGP fluorescentes internalizadas por la misma célula 310 indicada en la Figura 3B.

La Figura 4A es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 410; expuesta a partículas YGP etiquetadas fluorescentes, la Figura 4B es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 420, expuesta a partículas YGP que contienen ADN pIRES, una polietilénimina de polímero de captura catiónico (PEI) y hexadeciltrimetilamonibromuro detergente catiónico (también

conocido como cetiltrimetilamonibromuro o CTAB) que expresa GFP y la Figura 4C es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 430, expuesta a partículas YGP que contienen ADN pIRES, un quitosán de polímero de captura catiónico y CTAB detergente catiónico que expresa GFP.

5 La Figura 5A es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente y de luz combinada a color de células, por ejemplo, una célula indicada 510, expuesta a partículas YGP etiquetadas fluorescentes; la Figura 5B es una representación gráfica de los resultados de un estudio de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) que muestra un pico mayor 520 que representa la distribución de señales a partir de
10 células que tienen partículas YGP etiquetadas fluorescentes internalizadas y un pico menor 530 que representa la distribución de señales de células sin partículas YGP etiquetadas fluorescentes; la Figura 5C es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 540, expuesta a partículas YGP que contienen ADN etiquetado fluorescente, un polímero de captura catiónico PEI y CTAB detergente catiónico; la Figura 5D es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una
15 fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 540, la Figura 5E es una representación gráfica de los resultados de un estudio FACS que muestra un pico mayor 610 que representa la distribución de señales de células que tienen partículas YGP internalizadas con carga útil de ADN fluorescente y un soporte 620 que representa la distribución de señales de células sin partículas YGP; la Figura 5F es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 710, incubada con partículas YGP que contienen carga útil de ARN antisentido fluorescente; la Figura 5G es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 710; la Figura 5H es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una micrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 810, incubada con partículas YGP que contienen siARN etiquetado fluorescente, PEI y CTAB y la Figura 5I es una imagen
20 a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 810 que contiene partículas YGP internalizadas con carga útil de ARNi fluorescente.

Lo mencionado anteriormente y otros objetos, características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de
30 la siguiente descripción más particular de las modalidades preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos acompañantes en los cuales caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a través de las vistas diferentes. Los dibujos no están necesariamente a escala, preferentemente se coloca énfasis sobre los que ilustran los principios de la invención.

35 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un sistema de suministro de partícula que comprende una partícula de pared celular de levadura extraída y al menos una molécula de captura de carga útil como se reivindica en la reivindicación 1. Preferiblemente, la partícula de pared celular de levadura es fantasma de pared celular de levadura de 2-4 micrómetros.

40 *Moléculas de captura de carga útil*

La molécula de captura de carga útil es preferiblemente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las moléculas de captura y carga útil son ambas solubles en el sistema solvente; el sistema solvente debe ser absorbido a través de la matriz de carbohidrato de partícula de célula de levadura permitiendo la absorción del polímero de captura y carga útil. Las moléculas de captura y carga útil son preferiblemente solubles en agua. En modalidades preferidas, la molécula de captura es biodegradable.

50 El mecanismo de acción de la reacción de captura con una carga útil dada dicta la elección de la molécula de captura de carga útil. Para interacciones electrostáticas se requiere una molécula de captura de carga útil cargada de carga opuesta de la carga útil. Para atrapamiento físico, la molécula de captura de carga útil adecuadamente participa en la formación de una matriz que reduce la difusión de una carga útil. En otras modalidades, la molécula de captura de carga útil contribuye a propiedad de enlace hidrofóbico que contribuye a la retención de la carga útil. En modalidades
55 adicionales, la molécula de captura de carga útil selectivamente se une a la carga útil, proporcionando una interacción de afinidad que contribuye a la retención de la carga útil.

En general, polielectrolitos pueden ser moléculas de captura de carga útil adecuadas. Varios polielectrolitos adecuados se describen en la Patente Estadounidense No. 6,133,229. El polielectrolito puede ser un polielectrolito catiónico o aniónico. Los polielectrolitos anfotéricos también se pueden emplear. El polielectrolito catiónico es preferiblemente un polímero con grupos catiónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular. Los grupos catiónicos, los cuales en ciertas modalidades pueden incluir porciones derivadas de amonio cuaternario, pueden ser dispuestos en grupos laterales colgantes de la cadena o pueden ser incorporados en esta. Ejemplos de polielectrolitos catiónicos incluyen: copolímeros de vinil pirrolidona y metil metacrilato cuaternario por ejemplo, GAFQUAT®. series (755N, 734, HS-100) obtenidos de ISP; poli(acrilamidas sustituidas); polietilenimina, polipropilenimina y derivados sustituidos; homopolímeros de poliamina (GOLCHEM® CL118); copolímeros de poliamina (por ejemplo, condensados de epiclorohidrina y mono o dimetilamina); cloruro de polidialildimetilamonio (poliDADMAC); dextranos sustituidos; goma guar modificada (sustituida con cloruro de hidroxipropiltrimonio); proteínas sustituidas (por ejemplo, grupos cuaternarios

ES 2 355 916 T3

sustituídos en proteína de soya y colágeno hidrolizado); poliaminoácidos (por ejemplo, polilisina); compuestos de poliamino de bajo peso molecular (por ejemplo, espermina y espermidina). Polímeros naturales o artificiales pueden ser empleados. Polielectrolitos catiónicos con MW 150 a 5,000,000, preferiblemente 5000 a 500,000, más preferiblemente 5000 a 100,000 se pueden emplear. Una cantidad de 0.01 a 10% es preferida, más preferiblemente 0.1 a 2% p/v, especialmente 0.05 a 5%.

El polielectrolito aniónico es preferiblemente un polímero con grupos aniónicos distribuidos a lo largo de la cadena molecular. Los grupos aniónicos, los cuales pueden incluir carboxilato, sulfonato, sulfato u otros agrupamientos ionizables negativamente cargados, pueden estar dispuestos sobre grupos colgantes de la cadena o unidos directamente a la estructura polimérica. Se pueden emplear polímeros naturales o artificiales.

Ejemplos de polielectrolitos aniónicos incluyen: un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, un copolímero de metil vinil éter y ácido maleico, (Gantrez series AN-series y series S, respectivamente, International Specialty Products, Wayne, NJ); ácido algínico y sales; carboximetil celulosas y sales; poliacrilamidas sustituidas (por ejemplo, sustituidas con grupos de ácido carboxílico); ácidos poliacrílicos y sales; ácidos poliestirensulfónico y sales; sulfatos de dextrano; sacáridos sustituidos por ejemplo, octosulfato de sacarosa; heparina. Los polielectrolitos aniónicos con PM de 150 a 5,000,000 se pueden usar, preferiblemente 5000 a 500,000, más preferiblemente 5000 a 100,000. Una cantidad de 0.01% a 10% es especialmente preferida 0.05 a 5% muy especialmente 0.1 a 2% p/v.

Polímeros biológicos, tales como polisacáridos, son polímeros de captura preferidos. Preferiblemente, los polímeros son procesados a un peso molecular promedio a menos de 100,000 Daltons. Los polímeros son preferiblemente derivatizados para proporcionar características catiónicas o aniónicas. Los polisacáridos adecuados incluyen quitosán (quitina desacetilada), alginatos, dextranos, tales como 2-(dietilamino) etil éter dextrano (DEAE-dextrano) y sulfato de dextrano, xantanos, goma de algarrobo y gomas guar.

Moléculas catiónicas son adecuadas para uso como moléculas de captura con cargas útiles cargadas negativamente tales como polinucleótidos: polímeros catiónicos.

Se ha mostrado una amplia variedad de polímeros catiónicos para mediar la transfección *in vivo*, que varían de proteínas [tales como histonas (Fritz, J. D., *et al.*, (1996) Hum. Gene Ther. 7, 1395-1404) y proteínas del grupo de alta movilidad (HMG) (Mistry, A. R., *et al.* (1997) BioTechniques 22, 718-729)] y polipéptidos [tales como polilisina (Wu, G. Y. & Wu, C. H. (1987) J. Biol. Chem. 262, 4429-4432, Wagner, E., *et al.*, (1991) Bioconjugate Chem. 2, 226-231, péptidos sintéticos cortos (Gottschalk, S., *et al.*, (1996) Gene Ther. 3, 448-457; Wadhwa, M. S., *et al.*, (1997) Bioconjugate Chem. 8, 81-88), y péptidos anfifílicos helicoidales (Legendre, J. Y., *et al.*, (1997) Bioconjugate Chem. 8, 57-63; Wyman, T. B., *et al.*, (1997) Biochemistry 36, 3008-3017)] a polímeros sintéticos [tales como polietilenimina (Boussif, O., *et al.*, (1996) Gene Ther. 3, 1074-1080), dendrímeros catiónicos (Tang, M. X., *et al.*, (1996) Bioconjugate Chem. 7, 703-714; Haensler, J. *et al.*, (1993) Bioconjugate Chem. 4, 372-379), y polímeros de glucaramida (Goldman, C. K., *et al.*, (1997) Nat. Biotech. 15, 462-466)]. Otros polímeros catiónicos adecuados incluyen oligómeros de glicina N-sustituídos (peptoides) (Murphy, J.E., *et al.*, A combinatorial approach to the discovery of efficient cationic peptoid reagents for gene delivery, Proc Natl Acad Sci. USA, 1998 95 (4)1517-1522), poli(ácido 2-metil-acrílico 2-[(2-dimetilamino)-etil]-metil-amino]-etil éter), abreviado como pDAMA, y poli(2-dimetilamino etil)-metacrilato (pDMAEMA) (Funhoff, A.M., *et al.*, 2004 Biomacromolecules, 5, 32-39).

Las poliaminas adecuadas como moléculas de captura catiónicas se describen en las Patentes Estadounidenses No. 6,379,965 y 6,372,499.

Moléculas de Carga útil

El sistema de suministro de partícula de la presente invención es útil para suministro *in vivo* o *in vitro* de moléculas de carga útil que incluye, pero no se limita a, polinucleótidos tales como oligonucleótidos, constructos antisentido, siRNA, ARN enzimático, y constructos de ADN recombinante, que incluyen vectores de expresión.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención es útil para suministro *in vivo* o *in vitro* de moléculas de carga útil tales como aminoácidos, péptidos y proteínas. Por "proteína" significa una secuencia de aminoácidos para los cuales la longitud de cadena es suficiente para producir los niveles superiores de estructura terciaria y/o cuaternaria. Esto se distingue de "péptidos" u otros fármacos de peso molecular menor que no tienen tal estructura. Típicamente, la proteína aquí tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente al menos aproximadamente 20 kD.

Ejemplos de proteínas abarcadas dentro de la definición de la presente incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, hormona de crecimiento (GH), que incluye hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento bovino, y otros miembros de la familia del supergen GH; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroides; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina, cadena-insulina A; cadena-insulina B; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón, factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor del tejido factor IX, y factor von Willebrands; factores anti-coagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo de pulmón; un activador del plasminógeno;

tal como urocinasa o activador del plasminógeno tipo tejido (t-PA); bombazina; trombina; factor de necrosis del tumor alfa, factor de necrosis del tumor beta; encefalinas; RANTES (regulada en activación normalmente de células T expresadas y secretadas); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1-afa); albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora muleriana; relaxina de cadena A, relaxina de cadena B; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; ADNase; inhibina; activina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormona o factores del crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5, o 6 (NT-3, NT-4, o NT-6), o un factor de crecimiento del nervio tal como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF); factor de crecimiento del fibroblasto tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidermal (EGF); factor de crecimiento alfa de transformación (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta que incluye TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5; factor de crecimiento I similar a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-D cerebral); factor de crecimiento similar a insulina unido a la proteína; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; proteína morfogenética ósea (BMP); receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de decadencia (DAF); un antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores homing; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadesinas; anticuerpos y fragmentos o variantes de los mismos biológicamente activos o de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente.

Los miembros de la familia del supergen GH incluyen hormona de crecimiento, prolactina, lactógeno placentar, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-9, interleucina-10, interleucina-11, interleucina-12 (subunidad p35), interleucina-13, interleucina-15, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, factor inhibidor de leucemia, alfa interferona, beta interferona, gamma interferona, omega interferona, tau interferona, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, factor estimulador de colonia de macrófago, cardiotrofina-1 y otras proteínas identificadas y clasificadas como miembros de la familia.

La molécula de carga útil de la proteína es preferiblemente esencialmente pura y deseablemente esencialmente homogénea (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc). Proteína "esencialmente pura" significa una composición que comprende al menos aproximadamente 90% en peso de la proteína, con base en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente 95% en peso. Proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende al menos aproximadamente 99% en peso de proteína, con base en el peso total de la composición. Las proteínas se pueden derivar de fuentes que se originan naturalmente o producir por tecnología recombinante. Proteínas incluyen variantes de proteínas producidas por sustituciones de aminoácidos o por desprendimiento de proteína directo (Kurtzman, A.L., *et al.*, *Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins*, *Curr Opin Biotechnol.* 2001 12(4): 361-70) así como también derivados, tales como proteínas PEGiladas.

En ciertas modalidades, la proteína es un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente, por ejemplo. Objetivos moleculares ejemplares para anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia del receptor HER tal como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y alfav/beta3 integrina que incluyen ya sea subunidades alfa o beta de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/ft3, receptor de obesidad (OB); proteína C, etc.

Además de péptidos, polipéptidos y polinucleótidos, el sistema de suministro de partícula de la presente invención es adecuado para el suministro de moléculas más pequeñas, preferiblemente para el suministro de agente farmacéuticamente activo, más preferiblemente moléculas pequeñas terapéuticas. Cargas útiles de moléculas pequeñas adecuadas para el sistema de suministro de la presente invención incluyen agentes anticonceptivos tales como dietil estilbestrol, 17-beta-estradiol, estrona, etinil estradiol, mestranol, y similares; progestinas tales como noretindrona, norgestril, etinodiol diacetato, linestrenol, acetato de medroxiprogesterona, dimetisterona, acetato de megestrol, acetato de clormadinona, norgestimato, noretiesterona, etiesterona, melengestrol, noretinodrel y similares; y compuestos espermicidas tales como nonilfenoxipolioxietileno glicol, cloruro de benzetonio, clorindanol y similares. Preferiblemente, para tales cargas esteroidales, se usa una mezcla de moléculas de captura, que comprende una cantidad suficiente de un detergente para solubilizar la carga útil y un polímero para retener la carga útil dentro de la partícula de pared celular de levadura.

Otros agentes activos que pueden ser incorporados en el sistema de suministro de la presente invención incluyen agentes terapéuticos gastrointestinales tales como hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de sodio y similares; agentes antifertilidad no esteroideas; agentes parasimpatomiméticos; agentes psicoterapéuticos; tranquilizantes mayores tales como HCl de clorpromazina, clozapina, mesoridazina, metiapina, reserpina, tioridazina y similares; tranquilizantes menores tales como clordiazepóxido, diazepam, meprobamato, temazepam y similares; descongestionantes rinológicos; sedativos hipnóticos tales como codeína, fenobarbital, pentobarbital sódico, secobarbital sódico y similares; otros esteroides tales como testosterona y propionato de testosterona; sulfonamidas; agentes simpatomiméticos; vacunas; vitaminas y nutrientes tales como los aminoácidos esenciales, grasas esenciales y similares; antimalarías tales como 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, pirimetamina y similares; agentes anti-migraña tales como mazindol, fentermina y similares; agentes anti-Parkinson tales como L-dopa; anti-espasmódicos tales como atropina, bromuro de metescopolamina y similares; antiespasmódicos y agentes anticolinérgicos tales co-

ES 2 355 916 T3

mo terapia biliar, digestantes, enzimas y similares; antitusivos tales como dextrometorfano, noscapina y similares; broncodilatadores; agentes cardiovasculares tales como compuestos anti-hipertensivos, alcaloides Rauwolfia, vasodilatadores coronarios, nitroglicerina, nitratos orgánicos, pentaeritritotetranitrato y similares; reemplazos de electrolitos tales como cloruro de potasio; ergotalcaloides tales como ergotamina con y con cafeína, alcaloides ergot hidrogenados, metansulfato de dihidroergocristina, metansulfonato de dihidroergocornina, metansulfato de dihidroergocroiptina y combinaciones de los mismos; alcaloides tales como sulfato de atropina, Belladona, bromhidrato de hioscina y similares; analgésicos; narcóticos tales como codeína, dihidrocodienona, meperidina, morfina y similares; no narcóticos tales como salicilatos, aspirina, acetaminofeno, d-propoxifeno y similares.

En modalidades preferidas, el sistema de la presente invención se usa para suministrar antibióticos tales como las cefalosporinas, cloranfenicol, gentamicina, canamicina A, canamicina B, las penicilinas, ampicilina, estreptomycin A, antimicina A, cloropantenol, metronidazol, oxitetraciclina penicilina G, las tetraciclinas, y similares. En modalidades preferidas, la capacidad de los macrófagos del cuerpo para inactivar patógenos se intensifica por el suministro de antibióticos, tales como tetraciclina, a los macrófagos.

En otras modalidades preferidas, la presente invención proporciona un sistema para suministrar agentes anti-cancerígenos; anti-convulsionantes tales como mefenitoína, fenobarbital, trimetadiona; anti-eméticos tales como tietilperazina; antihistaminas tales como clorofinazina, dimenhidrinato, difenhidramina, perfenazina, tripelenamina y similares; agentes anti-inflamatorios tales como agentes hormonales, hidrocortisona, prednisolona, prednisona, agentes no hormonales, alopurinol, aspirina, indometacina, fenilbutazona y similares; prostaglandinas; fármacos citotóxicos tales como tiotepa, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalano, mostaza de nitrógeno, metotrexato y similares.

Vacunas

En modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención es útil para proporcionar suministro oral de vacunas. En modalidades preferidas, el sistema se usa para suministrar antígenos, tales como antígenos de tales microorganismos como *Neisseria gonorrhoea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Herpes virus* (humonis, tipos 1 y 2), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, *Streptococcus sp.* Grupo B, *Microplasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospirapomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, virus del herpes equino 1, virus de arteritis equina, virus IBR-IBP, virus BVD-MB, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* y similares. En otras modalidades, el sistema puede ser usado para suministrar anticuerpos neutralizantes que contrarrestan los microorganismos anteriores.

En otras modalidades, el sistema puede ser usado para suministrar enzimas tales como ribonucleasa, neuramidinasa, tripsina, glicógeno fosforilasa, deshidrogenasa láctica de esperma, hialuronidasa de esperma, adenosintrifosfatasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa esterasa alcalina, amino peptidasa, tripsina quimiotripsina, amilasa, muramidasa, proteínasa acrosomal, diesterasa, deshidrogenasa de ácido glutámico, deshidrogenasa de ácido succínico, beta-glicofosfatasa, lipasa, ATP-ase alfa-peptato gamma-glutamilo-transpeptidasa, esterol-3-beta-ol-deshidrogenasa, DPN-diaprorasa.

En modalidades preferidas, el sistema puede suministrar antígenos de agentes biológicos críticos de bioterrorismo, que incluyen agentes Categoría A tales como variola mayor (viruela), *Bacillus anthracis* (antrax), *Yersinia pestis* (plaga), toxina *Clostridium botulinum* (botulismo), *Francisella tularensis* (tularemia), filovirus (fiebre hemorrágica del Ébola, fiebre hemorrágica de Marburg), arnavirus (Lassa (fiebre de Lassa), Junin (fiebre hemorrágica Argentina) y virus relacionados); agentes de Categoría B tales como *Coxiella burnetti* (fiebre Q), especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), alfavirus (encefalomielitis Venezolana, encefalomielitis equina del este y oeste), toxina ricina de *Ricinus communis* (semillas de ricino), toxina épsilon de *Clostridium perfringens*; enterotoxina B de *Staphylococcus*, especies de *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, cepa de *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*; y agentes Categoría C tales como virus nipah, hantavirus, virus de fiebre hemorrágica por garrapata, virus de encefalitis por garrapata, fiebre amarilla, y tuberculosis resistente a fármacos múltiples.

En modalidades preferidas, el sistema puede ser usado para suministrar toxinas antigénicas inactivadas, tales como antígenos anatoxina, que incluye toxoides (toxinas antigénicas pero inactivadas), y conjugados toxoides. En modalidades preferidas, el toxoide es una toxina microbiana inactivada. En otras modalidades, el toxoide es una toxina vegetal inactivada. En modalidades adicionales, el toxoide es una toxina animal inactivada. En ciertas modalidades, el sistema puede ser usado para suministrar toxoides tales como toxoide pertussis, toxoide de *Corynebacterium diphtheria*, toxoide del tétano, conjugado de toxoide tetánico tipo b de *Haemophilus influenzae*, toxoide D de *Clostridium botulinum*, toxoide E de *Clostridium botulinum*, toxoide producido de Toxina A de *Clostridium difficile*, toxoide de *Vibrio cholerae*, toxoide Tipos C y D de *Clostridium perfringens*, toxoide de *Clostridium chauvoei*, toxoide de *Clostridium novyi* (Tipo B), toxoide de *Clostridium septicum*, toxoide recombinante del VIH tat IIIB, toxoide de *Staphylococcus*, toxoide de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx I, toxoide de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx II, toxoide de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx III, toxoide de proteína de la membrana exterior de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (OMP), toxoide elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*, toxoide de veneno de serpiente, toxoide de ricina,

ES 2 355 916 T3

toxoides de *Mannheimia haemolytica*, toxoides de *Pasteurella multocida*, toxoides de *Salmonella typhimurium*, toxoides de *Pasteurella multocida*, y toxoides de *Bordetella bronchiseptica*.

5 Técnicas para elaborar un toxoide de una toxina correspondiente, por ejemplo, tratamiento químico con formaldehído o sales de aluminio o irradiación gamma, se conocen en la técnica. Métodos recombinantes para convertir una toxina a un toxoide también se conocen (Fromen-Romano, C., *et al.*, Transformation of a non-enzymatic toxin into an
10 toxoid by genetic engineering, Protein Engineering vol. 10 no.10 pp. 1213-1220, 1997). En modalidades preferidas, el sistema de la presente invención puede ser usado para suministrar un toxoide recombinante. En otras modalidades preferidas, el sistema de la presente invención puede ser usado para suministrar un vector de expresión que codifica un toxoide recombinante.

15 Para producir una vacuna genética para proteger contra infección de patógeno, el material genético el cual codifica proteínas inmunogénicas contra las cuales una respuesta inmune protectora se puede montar, se debe incluir en la composición de ácido nucleico. Si el patógeno infecta intracelularmente, para lo cual la presente invención es particularmente útil, o extracelularmente, es poco probable que todos los antígenos patogénicos estimulen una respuesta protectora. Debido a que el ADN y ARN son ambos relativamente pequeños y pueden ser producidos relativamente de manera fácil, la presente invención proporciona la ventaja adicional de permitir la vacunación con antígenos patogénicos múltiples. La composición de ácido nucleico usada en la vacuna genética puede incluir material genético que
20 codifica muchos antígenos patogénicos. Por ejemplo, varios genes virales pueden ser incluidos en un constructo único, con ello proporcionando objetivos múltiples. Además, múltiples inoculantes los cuales pueden ser suministrados a diferentes células en un individuo pueden ser preparados para colectivamente incluir, en algunos casos, una serie completa o, más preferiblemente incompleta, por ejemplo, casi completa de genes en la vacuna. Por ejemplo, una serie completa de genes virales puede ser administrada usando dos constructos los cuales cada uno contiene una mitad diferente del genoma en el cual son administrados a sitios diferentes. De este modo, una respuesta inmune puede ser invocada contra cada antígeno sin el riesgo de que se monte un virus infeccioso. Esto permite la introducción de más de un objetivo de antígeno único y puede ser eliminado el requerimiento de que los antígenos protectores sean identificados.

25 De conformidad con la presente invención se proporciona también un método para conferir una respuesta inmune protectora de base amplia contra células hiperproliferantes que son características de enfermedades hiperproliferativas, así como también un método para tratar individuos que sufren de enfermedades hiperproliferativas. Como se usa en la presente, el término "enfermedades hiperproliferativas" significa referirse a aquellas enfermedades y trastornos caracterizados por hiperproliferación de células. Ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen todas las formas de cáncer y psoriasis.

30 Se ha descubierto que la introducción de una composición de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótido la cual codifica una proteína asociada a la "célula hiperproliferante" inmunogénica en las células de un individuo, resulta en la producción de aquellas proteínas en las células vacunadas de un individuo. Como se usa en la presente, el término "proteína asociada hiperproliferativa" significa referirse a proteínas que están asociadas con una enfermedad hiperproliferativa. Para inmunizar contra enfermedades hiperproliferativas, una composición de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótido la cual codifica una proteína que está asociada con una enfermedad hiperproliferativa se administra a un individuo.

35 Para que la proteína asociada hiperproliferativa sea un objetivo inmunogénico efectivo, debe ser una proteína que se produce exclusivamente o a niveles superiores en células hiperproliferativas comparadas con células normales. Los antígenos objetivos incluyen tales proteínas, fragmentos de las mismas y péptidos los cuales comprenden al menos un epítipo encontrado en tales proteínas. En algunos casos, una proteína asociada hiperproliferativa es el producto de una mutación de un gen que codifica una proteína. El gen mutado codifica una proteína la cual es casi idéntica a la proteína normal excepto que tiene una secuencia de aminoácido ligeramente diferente la cual resulta en un epítipo diferente no encontrado en la proteína normal. Tales proteínas objetivo incluyen aquellas codificadas las cuales son proteínas codificadas por oncogenes tales como myb, myc, fyn, y los genes de translocación bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk y EGRF. Además de los productos de oncogén como antígenos objetivo, las proteínas objetivo para tratamientos anticancerígenos y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos hechas por linfomas de células B, y regiones variables de receptores de células T de linfomas de células T las cuales, en algunas modalidades, también se usan como antígenos objetivo para enfermedades autoinmunes. Otras proteínas asociadas al tumor pueden ser usadas
50 como proteínas objetivo, tales como proteínas las cuales se encuentran a niveles superiores en células tumorales, que incluyen la proteína reconocida por anticuerpo 17-1A monoclonal y proteínas de enlace a folato.

55 Mientras la presente invención se puede usar para inmunizar un individuo contra una o más formas severas de cáncer, la presente invención es particularmente útil para inmunizar profilácticamente un individuo quién está pre-dispuesto a desarrollar un cáncer particular o quien ha tenido cáncer y es por lo tanto susceptible a una recaída. Los desarrollos en genética y biotecnología, así como también epidemiología, permiten la determinación de probabilidad y riesgo de valoración para el desarrollo de cáncer en un individuo. Usando selección genética y/o historial de salud familiar, es posible predecir la probabilidad que un individuo particular tiene para desarrollar cualquiera de los tipos severos de cáncer.

60 De manera similar, aquellos individuos quienes ya han desarrollado cáncer y aquellos que han sido tratados para eliminar el cáncer, o están de otro modo en remisión, son particularmente susceptibles a recaída o reincidencia. Como parte de un régimen de tratamiento, tales individuos pueden ser inmunizados contra el cáncer que ya han sido diag-

ES 2 355 916 T3

nosticados porque tienen para combatir tal reincidencia. De este modo, una vez que se sabe que individuos tienen un tipo de cáncer y están en riesgo de recaída, pueden ser inmunizados para preparar sus sistemas inmunes para combatir cualquier aparición futura del cáncer.

5 La presente invención también proporciona un método para tratar individuos que sufren de enfermedades hiperproliferativas. En tales métodos, la introducción de composiciones de péptido, proteína, carbohidrato o ácido nucleico y combinaciones de los mismos sirve como un inmunoterapéutico, dirigiendo y promoviendo el sistema inmune del individuo para combatir las células hiperproliferativas que producen la proteína objetivo.

10 La presente invención proporciona un método para tratar individuos que sufren de trastornos y enfermedades autoinmunes confiriendo una respuesta inmune protectora de base amplia contra objetivos que están asociados con autoinmunidad, que incluyen receptores celulares y células las cuales producen anticuerpos "auto"-dirigidos.

15 Enfermedades autoinmunes mediadas por las células T incluyen artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjogren, sarcoidosis, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), tiroiditis autoinmune, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, escleroderma, poliomiocitosis, dermatomiocitosis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Cada una de estas enfermedades es caracterizada por los receptores de células T que se enlazan a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de las células T podría estimular una respuesta inmune que incluye CTLs para eliminar aquellas células T.

20 En RA, varias regiones variables específicas de receptores de células T (TCRs) las cuales están involucradas en la enfermedad se han caracterizado. Estas TCRs incluyen $V\beta$ -3, $V\beta$ -14, $V\beta$ -17 y $V\alpha$ -17. De este modo, la vacunación con una composición compuesta de composiciones de péptido, proteína, carbohidrato o ácido nucleico y combinaciones de las mismas que suministran o codifican al menos una de estas proteínas estimularán una respuesta inmune que dirigirá células T involucradas en RA. Véase: Howell, M. D., *et al.*, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10921-10925; Paliard, X., *et al.*, 1991 Science 253: 325-329; Williams, W. V., *et al.*, 1992 J. Clin. Invest. 90: 326-333.

25 En MS, varias regiones variables específicas de TCRs las cuales están involucradas en la enfermedad se han caracterizado. Estas TCRs incluyen $V\beta$ -7 y $V\alpha$ -10. De este modo, la vacunación con una composición compuesta de composiciones de péptido, proteína, carbohidrato o ácido nucleico y combinaciones de las mismas que suministran o codifican al menos una de estas proteínas estimulará una respuesta inmune que dirigirá células T involucradas en MS. Véase: Wucherpfennig, K. W., *et al.*, 1990 Science 248: 1016-1019; Oksenberg, J. R., *et al.*, 1990 Nature 345: 344-346.

30 En escleroderma, varias regiones variables específicas de TCRs las cuales están involucradas en la enfermedad se han caracterizado. Estas TCRs incluyen $V\beta$ -6, $V\beta$ -8, $V\beta$ -14 y $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -3C, $V\alpha$ -7, $V\alpha$ -14, $V\alpha$ -15, $V\alpha$ -16, $V\alpha$ -28 y $V\alpha$ -12. De este modo, la vacunación con una composición compuesta de composiciones de péptido, proteína, carbohidrato o ácido nucleico y combinaciones de las mismas que suministran o codifican por al menos una de estas proteínas estimulará una respuesta inmune que dirigirá células T involucradas en escleroderma.

35 Para tratar pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune mediada por células T, particularmente aquellas para las cuales la región variable del TCR todavía ha sido caracterizada, se puede realizar una biopsia sinovial. Las muestras de las células T presentes pueden ser tomadas y la región variable de aquellas TCRs identificadas usando técnicas estándares. Las vacunas pueden ser preparadas usando esta información.

40 Enfermedades autoinmunes mediadas por células B incluyen Lupus (SLE), enfermedad de Grave, miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, asma, crioglobulinemia, esclerosis biliar primaria y anemia perniciosa. Cada una de estas enfermedades está caracterizada por anticuerpos los cuales se enlazan a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunes. La vacunación contra la región variable de tales anticuerpos podría estimular una respuesta inmune que incluye CTLs para eliminar aquellas células B que producen el anticuerpo.

45 Para tratar pacientes que sufren de una enfermedad autoinmune mediada por células B, se puede identificar la región variable de los anticuerpos involucrados en la actividad autoinmune. Se puede realizar una biopsia y se pueden tomar muestras de los anticuerpos presentes en un sitio de inflamación. La región variable de estos anticuerpos puede ser identificada usando técnicas estándares. Las vacunas pueden ser preparadas usando esta información.

50 En el caso de SLE, un antígeno se cree que es ADN. De este modo, en pacientes a ser inmunizados contra SLE, su suero puede ser seleccionado para anticuerpos anti-ADN y se puede preparar una vacuna la cual incluye composiciones de ácido nucleico que codifican la región variable de tales anticuerpos anti-ADN encontrados en el suero.

55 Características estructurales comunes entre las regiones variables de tanto TCRs como anticuerpos son bien conocidas. La secuencia de ADN que codifica una TCR particular o anticuerpo puede en general, encontrarse siguiendo métodos bien conocidos tales como aquellos descritos en Kabat, *et al.* 1987 Sequence of Proteins of Immunological Interest U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Md., la cual se incorpora en la presente por referencia. Además, un método general para clonar regiones variables funcionales a partir de anticuerpos se puede encontrar en Chaudhary, V. K., *et al.*, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1066.

Terapia de Gen

En modalidades preferidas, la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos o condiciones genéticas que tienen un componente genético. En modalidades preferidas adicionales, la presente invención proporciona composiciones útiles para la manufactura de productos farmacéuticos para el tratamiento de trastornos o condiciones genéticas que tiene un componente genético.

El proyecto de Genoma Humano ha incrementado el conocimiento de las bases genéticas de la enfermedad. Véase, en general, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/assist.shtml.

Factores tanto ambientales como genéticos tienen papeles en el desarrollo de cualquier enfermedad. Un trastorno genético es una enfermedad causada por anomalías en el material genético del individuo (genoma). Existen cuatro diferentes tipos de trastornos genéticos: (1) gen único, (2) multifactorial, (3) cromosomal, y (4) mitocondrial.

(1) Gen único (también llamado Mendeliano o monogénico) - Este tipo es causado por cambios o mutaciones que ocurren en la secuencia de ADN de un gen. Los genes codifican para proteínas las moléculas que portan la mayoría del trabajo, realizan la mayoría de las funciones vitales, y aún constituyen la mayoría de las estructuras celulares. Cuando un gen es mutado de manera que su producto de proteína no puede más llevar su función normal, puede resultar un trastorno. Existen más de 6,000 trastornos de gen único conocidos, los cuales ocurren en aproximadamente 1 de cada 200 nacimientos. Algunos ejemplos son fibrosis quística, anemia de células falciformes, síndrome de Marfan, enfermedad de Huntington y hemocromatosis hereditaria.

(2) Multifactorial (también llamado complejo o poligénico) - Este tipo es causado por una combinación de factores ambientales y mutaciones en genes múltiples. Por ejemplo, diferentes genes que influyen la susceptibilidad a cáncer de mama se han encontrado en los cromosomas 6, 11, 13, 14, 15, 17, y 22. Su naturaleza más complicada hace mucho más difícil de analizar que un gen único o trastornos cromosomales. Algunos de los trastornos crónicos más comunes son trastornos multifactoriales. Ejemplos incluyen enfermedad cardíaca, alta presión en sangre, enfermedad de Alzheimer, artritis, diabetes, cáncer y obesidad. La herencia multifactorial también está asociada con rasgos heredables tales como patrones en las huellas del dedo, altura, color de ojos y color de piel.

(3) Cromosomal - Cromosomas, estructuras distintas hechas de ADN y proteína, están localizadas en el núcleo de cada célula. Debido a que los cromosomas son portadores de material genético, tales anomalías en la estructura de cromosoma como reincorporación o rompimiento de grosor o copias adicionales o faltas (translocaciones) pueden resultar en la enfermedad. Algunos tipos de anomalías cromosomales mayores pueden ser detectadas por examinación microscópica. El síndrome de Down o trisomía 21 es un trastorno común que ocurre cuando una persona tiene tres copias del cromosoma 21.

(4) Mitocondrial - Esta tipo relativamente raro de trastorno genético es causado por mutaciones en el ADN no cromosomal de la mitocondria: las mitocondrias son organelos similares a varillas o redondos pequeños que están involucrados en la respiración celular y se encuentran en el citoplasma de células vegetales y animales. Cada mitocondria puede contener 5 a 10 piezas circulares de ADN.

En modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención se usa para administrar al menos un polinucleótido que comprende un gen de compensación. En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención se usa para administrar al menos un polinucleótido que codifica un producto de gen de un gen perdido, en donde la expresión del producto de gen es útil en el tratamiento del trastorno genético o el componente genético de una condición. En modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención que incluye la molécula de carga útil deseada es útil para la manufactura de un producto farmacéutico para el tratamiento de trastorno genético o el componente genético de una condición. Tales productos farmacéuticos son adecuadamente administrados oralmente, rectalmente, parenteralmente, (por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, o subcutáneamente) intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, intravesicalmente, localmente (por ejemplo, polvos, ungüentos o gotas), o como un atomizador nasal o bucal. Los productos farmacéuticos son preferiblemente administrados oralmente, bucalmente, y parenteralmente, más preferiblemente oralmente. Partículas cargadas con diferentes cargas útiles, por ejemplo, un polinucleótido, un polinucleótido, vector de expresión o un terapéutico de molécula pequeña, pueden ser mezclados en las proporciones apropiadas y administrados en conjunto, por ejemplo, en una cápsula, para terapia de combinación.

En aspectos de la presente invención que se refieren a terapia de gen, las composiciones de ácido nucleico contienen ya sea genes de compensación o genes que codifican proteínas terapéuticas. Ejemplos de genes de compensación incluyen un gene que codifica distrofina o un fragmento funcional, un gen para compensar el gen defectivo en pacientes que sufren de fibrosis quística, un gen para compensar el gen defectivo en pacientes que sufren de ADA, y un gene que codifica el Factor VIII. Ejemplos de genes que codifican proteínas terapéuticas incluyen genes los cuales codifican a eritropoyetina, interferona, receptor LDL, GM-CSF, IL-2, IL-4 y TNF. Adicionalmente, composiciones de ácido nucleico las cuales codifican componentes de anticuerpo de cadena única los cuales específicamente se enlazan a sustancias tóxicas pueden ser administradas. En algunas modalidades preferidas, se proporciona el gen distrofina como parte de un mini-gen y se usa para tratar individuos que sufren de distrofia muscular. En algunas modalidades preferidas, se proporciona un mini-gen el cual contiene secuencias codificantes para una proteína de distrofina parcial.

Las anomalías de distrofina son responsables de tanto la Distrofia Muscular de Becker más leve (BMD) como la Distrofia Muscular de Duchenne más severa (DMD). En distrofina de BMD se hace pero es anormal en ya sea tamaño y/o cantidad. El paciente es leve a moderadamente débil. En DMD no se hace proteína y el paciente está unido a la silla de ruedas desde los 13 años y usualmente muere a los 20 años. En algunos pacientes, particularmente aquellos que sufren de BMD, la proteína distrofina parcial producida por expresión de un mini-gen suministrado de conformidad con la presente invención, puede proporcionar función mejorada del músculo.

En modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos y condiciones genéticas que se cree que tienen un componente genético, tales como síndrome de Aarskog-Scott, síndrome de Aase, acondroplasia, acrodisostosis, adicción, adreno-leucodistrofia, albinismo, síndrome de abefaron-macrostomia, síndrome de Alagille, alcaptonuria, deficiencia de antitripsina alfa-1, síndrome de Alport, enfermedad de Alzheimer, asma, síndrome poliglandular autoinmune, síndrome de insensibilidad androgénica, síndrome de Angelman, ataxia, telangiectasia por ataxia, aterosclerosis, trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), autismo, calvicie, enfermedad de Batten, síndrome de Beckwith-Wiedemann, enfermedad de Best, trastorno bipolar, braquidactilia, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide crónica, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Crohn, labio leporino, síndrome de Cockayne, síndrome de Coffin Lowry, cáncer de colon, hiperplasia adrenal congénita, síndrome de Cornelia de Lange, síndrome de Costello, síndrome de Cowden, displasia craneofrontonasal, síndrome de Crigler-Najjar, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, fibrosis quística, sordera, depresión, diabetes, displasia diastrófica, síndrome de DiGeorge, síndrome de Down, dislexia, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de Dubowitz, displasia ectodermal, síndrome de Ellis-van Creveld, Ehlers-Danlos, epidermólisis bulosa (EB), epilepsia, temblor esencial, hipercolesterolemia familiar, fiebre del Mediterráneo familiar, fiebre del mediterráneo, síndrome de fragilidad X, ataxia de Friedreich, enfermedad de Gaucher, glaucoma, mala absorción de glucosa galactosa, glutaricaciduria, atrofia girata, síndrome de Goldberg Shprintzen (síndrome velocardiofacial), síndrome de Gorlin, enfermedad de Hailey-Hailey, hemihipertrofia, hemocromatosis, hemofilia, neuropatía motora y sensorial hereditaria (HMSN), cáncer colorrectal sin poliposis hereditaria (HNPCC), enfermedad de Huntington, inmunodeficiencia con hiper-IgM, diabetes de inicio juvenil, síndrome de Klinefelter, síndrome de Kabuki, enfermedad de Leigh (o Síndrome), síndrome QT prolongado, cáncer de pulmón, melanoma maligno, maniaco depresión, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, aborto involuntario, enfermedad de mucopolisacárido, neoplasia endócrina múltiple, esclerosis múltiple, distrofia muscular, esclerosis miotrófica lateral, distrofia miotónica, neurofibromatosis, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Noonan, obesidad, cáncer de ovario, supresor de tumor p53, cáncer pancreático, enfermedad de Parkinson, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome de Pendred, atrofia muscular peroneal, fenilcetonuria (PKU), enfermedad del riñón poliquistico, síndrome de Prader-Willi, cirrosis biliar primaria, cáncer de próstata, síndrome de REAR, enfermedad de Refsum, retinitis pigmentosa, retinoblastoma, síndrome de Rett, síndrome de Sanfilippo, esquizofrenia, inmunodeficiencia combinada severa, anemia de células falciformes, espina bífida, atrofia muscular espinal, atrofia espinocerebelar, SRY: determinación del sexo, síndrome de muerte repentina en adultos, enfermedad de Tangier, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de radio trombocitopenia ausente, síndrome de Townes-Brocks, esclerosis tuberosa, síndrome de Turner, síndrome de Usher, síndrome de von Hippel-Lindau, síndrome de Waardenburg, síndrome de Weaver, síndrome de Werner, síndrome de Williams, enfermedad de Wilson, xeroderma pigmentosa o síndrome de Zellweger.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos y condiciones genéticas que se cree que tienen un componente genético que son manifestadas como trastornos metabólicos, tales como trastornos relacionados con proteína, que incluyen Anemia de Células Falciformes y beta-Thalassemias, alfa-Thalassemias, Síndrome de Marfan, Ehlers-Danlos Tipo I, Ehlers-Danlos Tipo II, Ehlers-Danlos Tipo III, Ehlers-Danlos Tipo IV dominante autosomal, Ehlers-Danlos Tipo IV recesivo autosomal, Ehlers-Danlos Tipo IV-D, Ehlers-Danlos Tipo V, Ehlers-Danlos Tipo VI, Ehlers-Danlos Tipo VII dominante autosomal, Ehlers-Danlos Tipo VII recesivo autosomal, Ehlers-Danlos Tipo VIII. Ehlers-Danlos con Disfunción de Plaquetas, Cutis Laxa, Cutis Laxa recesivo Tipo I, Síndrome Cutis Laxa de Cuerno Occipital, X-ligado, Osteogénesis Imperfecta Tipo I, Osteogénesis Imperfecta Tipo I-C, Osteogénesis Imperfecta Silente Tipo II/III, Osteogénesis Imperfecta Tipo IV, forma de Osteogénesis Imperfecta Neonatal Letal, y Osteogénesis Imperfecta progresivamente deformante.

En modalidades preferidas adicionales, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos genéticos del sistema de coagulación, tales como afibrinogenemia, pérdida completa de fibrinógeno, Factor I; disfibrinogenemia disfuncional del fibrinógeno, Factor I; trastornos del Factor II; deficiencia del factor de tejido; deficiencia del Factor V, deficiencia del Factor lábil, deficiencia del Factor VII, deficiencia del Factor VIII (Hemofilia A), deficiencia del Factor IX (Hemofilia B), deficiencia del Factor X, deficiencia del Factor XI, Síndrome de Rosenthal, deficiencia de Antecedente de Tromboplastina del plasma (PTA), deficiencia del Factor XII, deficiencia del factor Hageman, deficiencia del Factor XIII, deficiencia combinada del Factor V y VIII, deficiencia combinada del Factor VIII y IX, Deficiencia combinada del Factor IX y XI, deficiencia de la Proteína C, deficiencia de la Proteína S, trombofilia, deficiencia de antitrombina III, síndrome de plaqueta gigante, deficiencia de glicoproteína Ib de plaquetas, enfermedad von Willebrand, deficiencia del Factor Fletcher y deficiencia de precalicreína.

En modalidades preferidas adicionales, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos de almacenaje de glicógeno, tales como Tipo 0, Tipo I (enfermedad de von Gierke), Tipo Ib, Tipo Ic, Tipo II (enfermedad de Pompe), Tipo IIb (enfermedad de Danon), Tipo III (enfermedad de Cori o enfermedad de Forbes), Tipo IV (enfermedad de Andersen), Tipo V (enfermedad de

ES 2 355 916 T3

McArdle), Tipo VI (enfermedad de Hers), Tipo VII (enfermedad de Tarui), Tipo VIII, Tipo IX, y Tipo XI (síndrome de Fanconi-Bickel).

En aún modalidades preferidas adicionales, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en metabolismo de fructuosa, galactosa y glicerol, tales como intolerancia hereditaria a la fructuosa, deficiencia de aldolasa B; fructosuria, deficiencia de fructocinasa hepática; galactosemia clásica, deficiencia de galactosa epimerasa; deficiencia de galactocinasa; hiperglicerolemia y deficiencia de glicerolcinasa.

En aún modalidades preferidas adicionales, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defecto en el metabolismo de colesterol y lipoproteína, tales como apolipoproteína(a)-Lp(a), hiperlipoproteïnemia Tipo I; hiperlipoproteïnemia Tipo Ib; deficiencia de apolipoproteína C-II; hiperlipoproteïnemia Tipo Ic, quilomicronemia; hipercolesterolemia familiar, hiperlipoproteïnemia Tipo II; hiperlipoproteïnemia Tipo II, hiperbetalipoproteïnemia familiar; hiperlipoproteïnemia Tipo III, deficiencia de apolipoproteína E; hiperlipoproteïnemia Tipo IV; hiperlipoproteïnemia Tipo V; deficiencia de LCAT familiar; enfermedad de Wolman; deficiencia de lipoproteína lipasa; hipertrigliceridemia familiar; hiperlipidemia Tipo V; hiperlipidemia Tipo VI; apo-B defectivo del ligando familiar; hiperalfalipoproteïnemia familiar; hipobetalipoproteïnemia, deficiencia de apolipoproteína B-100; abetalipoproteïnemia, síndrome de Kornzweig; y enfermedad de Tangier, deficiencia de lipoproteína de alta densidad familiar.

En aún modalidades preferidas adicionales, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos glicolípidos y mucopolisacáridos, tales como mucopolisacaridosis Tipo I H (Síndrome de Hurler), mucopolisacaridosis Tipo I S (síndrome de Scheie), mucopolisacaridosis Tipo I H/S (síndrome de Hurler/Scheie), mucopolisacaridosis Tipo II (síndrome de Hunter), mucopolisacaridosis Tipo III (Sanfilippo Tipo A, Sanfilippo Tipo B, Sanfilippo Tipo C, Sanfilippo Tipo D), mucopolisacaridosis Tipo IV (Tipo A de Morquio, Tipo B de Morquio), mucopolisacaridosis Tipo VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy) y mucopolisacaridosis Tipo VII (Síndrome de Sly).

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos de metabolismo glicoesfingolípido, tales como gangliosidosis GM1, que incluyen GM1 Tipo II generalizado, forma juvenil; GM1 Tipo III generalizado, forma adulta; gangliosidosis GM2, enfermedad de Sandhoff-Jatzkewitz; gangliosidosis GM3, enfermedad de Tay-Sachs, variante AB de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Schindler Tipos A, B, C1, C2 y D, enfermedad de Fabry, lactosilceramidosis, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, deficiencia de sulfatasa múltiple, enfermedad de Austin, leucodistrofia metacrómica, y lipodosis de sulfatida.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de oligosacaridosis tales como fucosidosis, mucopolipodosis VI, sialolipidosis, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, sialidosis Tipos I y II, galactosialidosis, síndrome de Goldberg y aspartilglucosaminuria.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos del transporte de enzima lisosomal tales como mucopolipodosis I, sialidosis; mucopolipodosis II, enfermedad de células I; y mucopolipodosis III, polidistrofia de pseudo-Hurler.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en el metabolismo de ácido orgánico y aminoácido tales como fenilcetonuria; tirosinemia Tipo I, tirosinosis; tirosinemia Tipo II, síndrome de Richner-Hanhart; tirosinemia Tipo III; alcaptonuria; homo-cistinuria; histidinemia; enfermedad de jarabe de maple en orina (MSUD); MSUD Tipo Ib, MSUD Tipo II; aciduria metilmalónica; hiperglicinemia no cetónica Tipo I (NKHI) e hiperlisinemia.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en el ciclo de urea tales como hiperamonemias; deficiencia de carbamoil fosfato sintetasa I (CPS-I); deficiencia de ornitina trascarbamilasa (OTC); deficiencia de N-acetilglutamato sintetasa; aciduria arginino-succínica, deficiencia de argininosuccinato liasa; hiperargininemia, deficiencia de arginasa; citrulinemia, deficiencia de argininosuccinato sintetasa y deficiencia de ornitina aminotransferasa. En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en el transporte de aminoácido tales como cistinuria Tipo I; cistinuria Tipo III; enfermedad de Hartnup y síndrome de hiperamonemia-hiperornitinemia-homocitrulinuria (HHH). En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de porfirias y bilirubinemias tales como porfiria eritropoyética congénita (CEP); protoporfiria eritropoyética (EPP); deficiencia de porfiria ALA deshidratasa (ADP); porfiria intermitente aguda (AIP); coproporfiria hereditaria (HCP); porfiria variegata (VP); porfiria cutánea tarda (PCT); porfiria hepato-eritropoyética (HEP); síndrome de Gilbert; síndrome de Crigler-Najjar, Tipos I y I; síndrome de Dubin-Johnson y síndrome de Rotor.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de errores en el metabolismo de ácido graso tales como deficiencia de deshidrogenasa acil-CoA de cadena muy larga (VLCAD); deficiencia de deshidrogenasa acil-CoA de cadena larga

(LCAD); deficiencia de deshidrogenasa acil-CoA de cadena media (MCAD); deficiencia de deshidrogenasa acil-CoA de cadena corta (SCAD); deficiencia de carnitina translocasa; deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I) y deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa II (CPT II). En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en el metabolismo de nucleótido tales como síndrome Lesch-Nyhan; Inmunodeficiencia Combinada Severa de la Enfermedad (SCID), debido a deficiencia de adenosina desaminasa (ADA); gota; litiasis renal, debido a deficiencia de adenina fosforibosiltransferasa (APRT); xantínuria, debido a deficiencia de xantina oxidasa; aciduria orótica, Tipos I y I y deficiencia de ornitina transcarbamoylase.

En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos en el metabolismo de metal y transporte tales como enfermedad de Wilson, enfermedad de Menkes, síndrome de cuerno occipital y hemocromatosis. En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos en peroxisomas tales como síndrome de Zellweger, adreoleucodistrofia ligada X, adreoleucodistrofia neonatal (NALD), condrodistrofia punctata rizomélica (RCPD) y enfermedad de Regsum infantil (IRD). En otras modalidades preferidas, el sistema de suministro de partícula de la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos asociados con reparación de ADN defectivo tales como ataxia telangiectasia (AT), xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne, síndrome de Bloom y anemia de Fanconi.

Rutas de administración

Las rutas de administración incluyen pero no se limitan a oral, bucal, sublingual, pulmonar, transdérmica, transmucosal, así como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, e intramuscular. Rutas preferidas de administración son oral; bucal, sublingual, pulmonar y transmucosal.

El sistema de suministro de partícula de la presente invención se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. El sistema de suministro de partícula se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable. Además, un compuesto o composición se puede administrar todo en una vez, como por ejemplo, por inyección de bolo, en múltiples veces, tal como por una serie de tabletas, o de manera uniforme sustancialmente suministrada sobre un periodo de tiempo, como por ejemplo, usando una formulación de liberación controlada. También se nota que la dosis del compuesto puede ser variada sobre el tiempo. El sistema de suministro de partícula se puede administrar usando una formulación de liberación inmediata, una formulación de liberación controlada, o sus combinaciones. El término "liberación controlada" incluye liberación sostenida, liberación retardada, y combinaciones de las mismas.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, empaquetar, o vender a granel, como una dosis unitaria sencilla, o como una pluralidad de dosis unitarias sencillas. Como se usa aquí, una "dosis unitaria" es la cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que puede ser administrado a un paciente o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosificación.

Las cantidades relativas del ingrediente activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquiera de los ingredientes adicionales en una composición farmacéutica de la invención variará, dependiendo de la identidad, tamaño, y condición del humano tratado y además dependiendo de la ruta por la cual la composición se administra. A manera de ejemplo, la composición puede comprender entre 0.1% y 100% (p/p) de ingrediente activo. Una dosis unitaria de una composición farmacéutica de la invención generalmente comprenderá de aproximadamente 100 miligramos a aproximadamente 2 gramos del ingrediente activo, y preferiblemente comprende de aproximadamente 200 miligramos a aproximadamente 1.0 gramos del ingrediente activo.

Además, un sistema de suministro de partícula de la presente invención se puede administrar solo, en combinación con otro sistema de suministro de partícula con una carga útil, o con otros compuestos activos farmacéuticamente. Los otros compuestos activos farmacéuticamente se pueden seleccionar para tratar la misma condición como el sistema de suministro de partícula o una condición diferente.

Si el paciente recibe o es que recibe compuestos activos farmacéuticamente múltiples, los compuestos se pueden administrar de manera simultánea o secuencial en cualquier orden. Por ejemplo, en el caso de tabletas, los compuestos activos se pueden encontrar en una tableta o en tabletas separadas, que se pueden administrar en una vez o de manera secuencial en cualquier orden. Además, se debe reconocer que las composiciones pueden estar en formas diferentes. Por ejemplo, uno o más compuestos se pueden suministrar vía una tableta, mientras otro se administra vía inyección u oralmente como un jarabe.

Otro aspecto de la invención describe un kit que comprende una composición farmacéutica de la invención y material de instrucciones. Material de instrucciones incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se usa para comunicar la utilidad de la composición farmacéutica de la invención para uno de los propósitos expuestos aquí en un humano. El material de instrucciones también puede, por ejemplo, describir una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la invención. El material de instrucciones del kit de la invención

puede, por ejemplo, se fijado a un contenedor que contiene una composición farmacéutica de la invención o ser incluido junto con un contenedor que contiene la composición farmacéutica. De manera alternativa, el material de instrucciones se puede incluir de manera separada del contenedor con la intención de que el material de instrucciones y la composición farmacéutica se use cooperativamente por el recipiente.

La invención también incluye un kit que comprende una composición farmacéutica de la invención y un dispositivo de suministro para suministrar la composición a un humano. A manera de ejemplo, el dispositivo de suministro puede ser una botella de rociado flexible, una botella de rociado de dosis medida, un dispositivo de rociado en aerosol, un atomizador, un dispositivo de suministro de polvo seco, un solvente auto-propelente/dispositivo de dispersión en polvo, una jeringa, una aguja, un tapón, o un contenedor de medición de dosificación. El kit puede además comprender un material de instrucciones como se describe aquí.

Por ejemplo, un kit puede comprender dos composiciones farmacéuticas separadas que comprenden respectivamente una primera composición que comprende un sistema de suministro de partícula y un portador farmacéuticamente aceptable; y la composición que comprende el segundo compuesto activo farmacéuticamente y un portador farmacéuticamente aceptable. El kit también comprende un contenedor para las composiciones separadas, tal como una botella dividida o un paquete de lámina dividida. Ejemplos adicionales de contenedores incluyen jeringas, cajas, bolsas, y lo similar. Usualmente, un kit comprende direcciones para la administración de los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados son preferiblemente administrados en diferentes formas de dosificación (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en diferentes intervalos de dosificación, o cuando la valoración de los componentes individuales de la combinación se desea por el médico que prescribe.

Un ejemplo de un kit es un paquete de ampollas. Paquetes de ampollas son bien conocidos en la industria de empaque y están siendo ampliamente usados para el empaquetamiento de formas de dosificación unitarias farmacéuticas (tabletas, cápsulas, y lo similar). Paquetes de ampollas generalmente consisten de una hoja de material relativamente rígido cubierto con una lámina de un material plástico transparente preferiblemente. Durante el proceso de empaque se forman huecos en la lámina de plástico. Los huecos tienen el tamaño y forma de las tabletas o cápsulas a ser empacadas. Después, las tabletas o cápsulas se colocan en los huecos y una hoja de material relativamente rígido se sella contra la lámina de plástico en la cara de la lámina que es opuesta de la dirección en la cual los huecos se forman. Como un resultado, las tabletas o cápsulas se sellan en los huecos entre la lámina de plástico y la hoja. Preferiblemente la fuerza de la hoja es tal que las tabletas o cápsulas se pueden remover del paquete de ampolla mediante presión aplicada manualmente en los huecos con lo cual una abertura se forma en la hoja en el lugar del hueco. La tableta o cápsula después se remueve vía dicha abertura.

Puede ser deseable proveer una ayuda de memoria en el kit, por ejemplo, en la forma de números siguientes a las tabletas o cápsulas con lo cual los números corresponden con los días del régimen que las tabletas o cápsulas así especificadas se deben ingerir. Otro ejemplo de dicha ayuda a la memoria es un calendario impreso en la tarjeta, por ejemplo como sigue: "Primera semana, lunes, martes, ... etc.... Segunda semana, lunes, martes" etc. Otras variaciones de ayuda de memoria serán fácilmente aparentes. Una "dosis diaria" puede ser una tableta sencilla o cápsula o varias píldoras a ser tomadas en un día dado. También, una dosis diaria de una composición de sistema de suministro de partícula puede consistir de una tableta o cápsula, mientras una dosis diaria del segundo compuesto puede consistir de varias tabletas o cápsulas y viceversa. La ayuda de memoria debe reflejar esta y ayudar en la administración correcta.

En otra modalidad de la presente invención, se provee un dispensador diseñado para dispensar las dosis diarias una en una vez en el orden de su uso destinado. Preferiblemente, el dispensador se equipa con una ayuda de memoria, de modo que además facilita el cumplimiento con el régimen de dosificación. Un ejemplo de dicha ayuda de memoria es un contador mecánico, que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de dicha ayuda de memoria es una memoria con microprocesador energizado con batería acoplada con un lector de cristal líquido, una señal de recordatorio audible que, por ejemplo lee fuera de la fecha en que la última dosis diaria se ha tomado y/o recuerda cuando la siguiente dosis se debe tomar.

Una composición de sistema de suministro de partícula, opcionalmente que comprende otros compuestos activos farmacéuticamente, se pueden administrar a un paciente ya sea oralmente, rectalmente, parenteralmente, (por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, o subcutáneamente) de forma intracisternal, intravaginalmente, intraperitonealmente, intravesicularmente, localmente (por ejemplo, polvos, ungüentos, o gotas), o como un rociado bucal o nasal.

Administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier ruta de administración caracterizado por el rompimiento físico de un tejido de un humano y la administración de la composición farmacéutica a través del rompimiento del tejido. Administración parenteral de esta manera incluye la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra el tejido, y lo similar. En particular, la administración parenteral incluye subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, o inyección intraesternal o intravenosa, intraarterial o técnicas de infusión dialítica de riñón.

ES 2 355 916 T3

Composiciones adecuadas para inyección parenteral comprenden el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable tal como soluciones acuosas no acuosas estériles fisiológicamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o pueden comprender polvos estériles para reconstitución en soluciones inyectables estériles o dispersiones. Ejemplos de portadores acuosos o no acuosos adecuados, diluyentes, solventes o vehículos incluyen agua, solución salina isotónica, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, y lo similar), sus mezclas adecuadas, triglicéridos, que incluyen aceites vegetales tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y/o mediante el uso de agente tensoactivos. Dichas formulaciones se pueden preparar, empacar, o vender en una forma adecuada para administración de bolo o para administración continua. Formulaciones inyectables se pueden preparar, empacar, o vender en forma de dosificación unitaria, tal como ampollas, en contenedores de dosis múltiples, que contienen un conservador, o un dispositivo de uso sencillo para auto-inyección o inyección por un practicante médico.

Formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas, y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantable. Dichas formulaciones pueden además comprender uno o más ingredientes adicionales que incluyen agentes de suspensión, estabilización, o dispersión. En una modalidad de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se provee en forma seca (es decir, polvo o granular) para reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril) antes de administración parenteral de la composición reconstituida. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, empacar, o vender en la forma de una suspensión o solución acuosa o aceitosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además del ingrediente activo, ingredientes adicionales tal como agentes de dispersión, agentes humectantes, o agentes de suspensión descritos aquí. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar usando un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanediol, por ejemplo. Otros diluyentes y solventes aceptables incluyen solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónico, y aceites fijados tal como mono- o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellos que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema de polímero biodegradable. Composiciones para liberación sostenida o implantación puede comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tal como emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero soluble que se ingiere, o una sal soluble que se ingiere.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tal como agentes de conservación, humectación, emulsionamiento, y/o dispersión. Prevención de contaminación por microorganismos de las composiciones se pueden realizar por la adición de varios agentes antibacterianos y anti-fúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y lo similar. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y lo similar. Absorción prolongada de composiciones farmacéuticas inyectables se pueden llevar por el uso de agentes capaces de absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Formas de dosificación pueden incluir implantes o depósitos inyectables o sólidos. En modalidades preferidas, el implante comprende una alícuota del sistema de suministro de partícula y un polímero biodegradable. En modalidades preferidas, un polímero biodegradable adecuado se puede seleccionar del grupo que consiste de poliaspartato, poliglutamato, poli(L-láctido), un poli(D,L-láctido), un poli(láctido-co-glicólido), un poli(ϵ -caprolactona), un polianhídrido, un poli(beta-hidroxi butirato), un poli(orto éster) y un polifosfazeno.

Formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, polvos, y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el sistema de suministro de partícula es opcionalmente mezclado con al menos un excipiente habitual inerte (o portador) tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio o (a) sustancias de relleno o entendedores, como por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, manitol, o ácido silícico; (b) aglutinantes, como por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, o acacia; (c) humectantes, como por ejemplo, glicerol; (d) agentes de desintegración, como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio, papa o almidón de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos de complejo, o carbonato de sodio; (e) retardantes de solución, como por ejemplo, parafina; (f) aceleradores de absorción, como por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, como por ejemplo, alcohol cetílico o monoestearato de glicerol; (h) adsorbentes, como por ejemplo, caolín, o bentonita; y/o (i) lubricantes, como por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, o sus mezclas. En el caso de cápsulas y tabletas, las formas de dosificación también pueden comprender agentes reguladores de pH.

Una tableta que comprende el sistema de suministro de partícula puede, por ejemplo, ser preparada al comprimir o moldear el ingrediente activo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Tabletas comprimidas se pueden preparar al comprimir, en un dispositivo adecuado, el ingrediente activo en una forma que fluye libre tal como un polvo preparación granular, opcionalmente mezclada con uno o más de aglutinantes, un lubricante, un excipiente, un agente activo superficial, y un agente de dispersión. Tabletas moldeadas se pueden hacer al moldear, en un dispositivo adecuado, una mezcla de ingrediente activo, un portador farmacéuticamente aceptable y al menos líquido suficiente para humectar la mezcla. Excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de tabletas incluyen diluyentes inertes, agentes de granulación y desintegración, agentes aglutinantes y agentes lubricantes. Agentes de dispersión conocidos incluyen almidón de papa y glicolato almidón de sodio. Los agentes activos superficiales conocidos incluyen lauril sulfato de sodio. Diluyentes conocidos incluyen carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, fosfato hidrógeno de calcio y fosfato de sodio. Agentes de granulación y de-

sintegración conocidos incluyen almidón de maíz y ácido algínico. Agentes aglutinantes conocidos incluyen gelatina, acacia, almidón de maíz pre-gelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropil metilcelulosa. Agentes de lubricación conocidos incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

5 Tabletas pueden ser no recubiertas o pueden estar cubiertas mediante métodos conocidos para lograr la desintegración retrasada en el tracto gastrointestinal de un humano, lo que proporciona la liberación sostenida y absorción del sistema de suministro de partícula, por ejemplo, en la región del parche de Peyer en el intestino delgado. A modo de ejemplo, un material como gliceril monostearato o distearato de glicerilo puede utilizarse para recubrir las tabletas. Aún más a modo de ejemplo, las tabletas pueden estar cubiertas según métodos descritos en la Patente Estadounidense
10 Nos. 4,256,108; 4,160,452; y 4,265,874 para formar tabletas de liberación controlada de forma osmótica. Las tabletas además pueden constar de un agente de edulcoración, agente saborizante, un agente de color, un preservativo o alguna combinación de estos para proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y apetitosa.

15 Formas de dosificación sólida como tabletas, grageas, cápsulas y gránulos pueden ser preparados con revestimientos o cubiertas, como recubrimientos entéricos y otros bien conocidos en la técnica. También pueden contener agentes opacantes y también pueden ser de esa composición que liberan el sistema de suministro de partícula de manera retardada. Ejemplos composiciones de fijación que se pueden utilizar son ceras y sustancias poliméricas. Los compuestos activos también pueden estar en forma micro-encapsulada, si procede, con uno o más de los excipientes antes mencionados.

20 Composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden utilizar como rellenos en cápsulas de gelatina blanda o dura utilizando esos excipientes como lactosa o azúcar de la leche, así como glicoles de polietileno de alto peso molecular y lo similar. Cápsulas duras que comprenden el sistema de suministro de partícula se pueden hacer mediante una composición fisiológicamente degradable, tal como la gelatina. Estas cápsulas duras comprenden el sistema de suministro de partícula y pueden comprender aún más ingredientes adicionales como, por ejemplo, un diluyente sólido
25 inerte como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. Cápsulas de gelatina blanda que integran el sistema de suministro de partícula se pueden hacer mediante una composición fisiológicamente degradable, tal como la gelatina. Estas cápsulas blandas comprenden el sistema de suministro de partícula, que se puede mezclar con agua o un medio aceitoso tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

30 Composiciones orales se pueden hacer, utilizando tecnología conocida, que específicamente libera agentes administrados por vía oral en el intestino delgado y grueso de un paciente humano. Por ejemplo, formulaciones para el suministro en el sistema gastrointestinal, incluyendo el colon, incluyen sistemas con recubrimiento entérico, basados, por ejemplo, en copolímeros de metacrilato tales como poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo), que sólo son solubles a pH 6 y superior, para que el polímero sólo comience a disolverse a su entrada en el intestino delgado. El sitio donde se desintegran tales formulaciones de polímero depende de la tasa de tránsito intestinal y la cantidad de polímero presente. Por ejemplo, una capa de polímero relativamente gruesa se utiliza para el suministro en el colon proximal (Hardy *et al.*, 1987 Aliment. Pharmacol. Therap. 1: 273-280). También se pueden utilizar polímeros capaces de proporcionar suministro al colon específico del sitio, en el que el polímero se basa en la flora bacteriana del intestino grueso para proporcionar la degradación enzimática de la capa de polímero y, por tanto, liberación del fármaco. Por ejemplo, azopolímeros (Patente de E.U.A. No. 4,663,308), glicósidos (Friend *et al.*, 1984, J. Med. Chem. 27: 261-268) y una variedad de polisacáridos naturalmente disponibles y modificados (ver la solicitud de PCT PCT/GB89/00581) se pueden usar en dichas formulaciones.

45 Tecnología de liberación pulsada como la que se describe en la Patente de E.U.A. 4,777,049 también puede utilizarse para administrar el sistema de suministro de partícula a una ubicación específica dentro del tracto gastrointestinal. Estos sistemas permiten el suministro en un tiempo predeterminado y se pueden usar para suministrar el sistema de suministro de partícula, de forma opcional, junto con otros aditivos que pueden alterar el microentorno local para promover la estabilidad y absorción, directamente sin tener que depender de las condiciones externas diferentes de la presencia de agua para proporcionar la liberación *in vivo*.

50 Formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, la forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, como el agua u otros solventes, solución salina isotónica, agentes de solubilización y emulsionantes, como por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites, en particular, aceite de almendras, aceite de maní, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, MIGLYOL™, glicerol, aceites fraccionados vegetales, aceites minerales, como la parafina líquida, alcohol tetrahidrofurfurílico, glicoles de polietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias y lo similar. Además de estos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensión, emolientes, conservantes, reguladores de pH, sales, edulcorantes, saborizantes, agentes colorantes y de perfume. Las suspensiones, además del compuesto activo, pueden contener agentes de suspensión, como por ejemplo, alcoholes isostearílicos etoxilados, sorbitol polioxietileno o ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, grasas comestibles hidrogenadas, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma de acacia, agar-agar y derivados de celulosa como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metahidróxido de aluminio, bentonita o mezclas de estas sustancias y lo similar. Formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención que son adecuadas para administración por vía oral se pueden preparar, envasar y vender en forma líquida o en forma de un producto seco destinado a la reconstitución con agua o con otro vehículo adecuado antes de utilizarse.

ES 2 355 916 T3

Agentes de dispersión o humectación conocidos incluyen fosfatidas naturales tales como la lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido hexitol (por ejemplo, estearato de polioxietileno, heptadecaetilenooxicetanol, sorbitol monooleato de polioxietileno y sorbitán monooleato de polioxietileno, respectivamente). Agentes emulsionantes conocidos incluyen lecitina y acacia. Conservantes conocidos incluyen metilo, etilo o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico. Agentes de edulcoración conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilen glicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Agentes de espesamiento conocidos para suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura y alcohol cetílico.

En otras modalidades, la composición farmacéutica puede ser preparada como un nutracéutico, es decir, en forma de, o agregada a, un alimento (por ejemplo, un elemento transformado destinado a la alimentación directa) o de un producto alimenticio (por ejemplo, un ingrediente comestible destinado a la incorporación de un alimento antes de ingestión). Ejemplos de alimentos adecuados incluyen dulces como piruletas, productos horneados, como galletas, panes, pastelitos y bocadillos, frutas enteras, puré o hervidas y vegetales, bebidas y productos cárnicos procesados. Ejemplos de productos alimenticios adecuados incluyen granos molidos y azúcares, especias y otros condimentos y jarabes. Los sistemas de suministro de partícula descritos en el presente documento preferiblemente no estén expuestos a altas temperaturas de cocción durante largos períodos de tiempo, con el fin de minimizar la degradación de los compuestos.

Composiciones para administración rectal o vaginal se pueden preparar por la mezcla de un sistema de suministro de partícula con los excipientes adecuados no irritantes o portadores, como manteca de cacao, polietilén glicol o una cera de supositorio, que son sólidos a temperatura ambiente normal, pero líquidos a la temperatura corporal, y por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el sistema de suministro de partícula. Tal composición puede estar en forma de, por ejemplo, un supositorio, una preparación de enema de retención y una solución para el riego colónico o rectal. Formulaciones de supositorio pueden constar de varios ingredientes adicionales como antioxidantes y conservantes. Preparaciones o soluciones de enema de retención para el riego colónico o rectal son posibles mediante la combinación de ingrediente activo con un portador líquido farmacéuticamente aceptable. Como es conocido en la técnica, preparaciones de enema pueden administrarse con, y pueden envasarse, dentro de un dispositivo de suministro adaptado a la anatomía rectal de un ser humano. Preparaciones de enema pueden comprender además de varios ingredientes adicionales como antioxidantes y conservantes.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Estas composiciones están convenientemente en forma de polvo seco para la administración con un dispositivo que comprende un reservorio de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de impelente para dispersar el polvo o usando un solvente auto-impelente/dispensador de polvo como un dispositivo que comprende el sistema de suministro de partícula suspendido en un impelente de bajo punto de ebullición en un recipiente hermético. Composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido, como el azúcar y convenientemente se proporcionan en una forma de dosis unitaria. Impelentes de bajo punto de ebullición generalmente incluyen impelentes líquidos cuyo punto de ebullición por debajo de 65°F a presión atmosférica. Por lo general el impelente puede constituir 50 a 99.9% (p/p) de la composición y el ingrediente activo puede constituir el 0.1% al 20% (p/p) de la composición. El impelente además puede comprender ingredientes adicionales como un agente tensoactivo líquido no iónico o sólido aniónico o un diluyente sólido (preferentemente con un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que integran el sistema de suministro de partícula).

Composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para suministro pulmonar también pueden proporcionar el ingrediente activo en forma de gotas de una suspensión. Tales formulaciones pueden ser preparadas, envasadas o vendidas como suspensiones acuosas o diluidas alcohólicas, opcionalmente estériles, que comprenden el sistema de suministro de partícula, y convenientemente pueden administrarse con cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Tales formulaciones pueden constar además de uno o más ingredientes adicionales como un agente saborizante como la sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente de regulación de pH, un agente activo superficialmente o un conservante tal como metilhidroxibenzoato.

Las formulaciones que se describen en este documento, siendo útiles para el suministro pulmonar también son útiles para el suministro intranasal de una composición farmacéutica de la invención. Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el sistema de suministro de partícula. Esta formulación es administrada en la forma de una aspiración, es decir, por inhalación rápida a través del paso nasal de un contenedor del polvo que se mantiene cerca a los orificios de la nariz.

Una composición farmacéutica de la invención puede prepararse, envasarse o venderse en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones por ejemplo, pueden estar en forma de tabletas o pastillas hechas usando métodos convencionales y pueden, por ejemplo, comprender un sistema de suministro de partículas de 0.1% al 20% (p/p), el equilibrio que comprende una composición oral que se puede disolver o degradar y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Como alternativa, formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una solución de aerosol o atomizada o suspensión que comprende el sistema de suministro de partículas.

Anticuerpos

Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (Mab) pretende incluir las moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo (como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de específicamente unirse a proteínas. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, claro más rápidamente de la circulación y puede tener menos tejido no específico de unión que un anticuerpo intacto. Por lo tanto, estos fragmentos son preferidos, así como los productos de un Fab u otra genoteca de expresión de inmunoglobulina. Por otra parte, anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

Anticuerpos pueden prepararse utilizando cualquier número de técnicas conocidas en la técnica. A continuación se examinan brevemente las técnicas adecuadas. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Anticuerpos policlonales pueden tener ventajas significativas para el desarrollo inicial, incluyendo la rapidez de producción y especificidad para múltiples epítopes, garantizar una tinción fuerte inmunofluorescente y captura de antígeno. Los anticuerpos monoclonales son adaptables a la producción a gran escala; modalidades preferidas incluyen al menos un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo del antígeno objetivo. Debido a que las preparaciones policlonales no se pueden reproducir fácilmente para la producción a gran escala, otra modalidad utiliza un cóctel de por lo menos cuatro anticuerpos monoclonales.

Un polipéptido Fv de cadena simple (“scFv” o “sFv”) es un heterodímero V_H:V_L enlazado de forma covalente que se puede expresar de un ácido nucleico incluyendo secuencias de codificación de V_H-V_L ya sea directamente unidas o unidas por un enlazador de codificación de péptidos. Huston, *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 85: 5879-5883 (1988). Un número de estructuras para convertir las cadenas de polipéptido, naturalmente agregada de cadena sencilla o pesada, pero químicamente separadas, desde una región de anticuerpo V en una molécula de scFv que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de enlace a antígeno. Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense Nos. 6,512,097, 5,091,513 y 5,132,405 y 4,956,778.

En una clase de modalidades, métodos de diseño recombinante pueden utilizarse para desarrollar estructuras químicas adecuadas (enlazadores) para convertir dos cadenas de polipéptido ligera y pesada naturalmente asociada, pero químicamente separadas, desde una región variable de anticuerpo en una molécula de sFv que pliega en una estructura tridimensional que es sustancialmente similar a la estructura de anticuerpo nativo. Criterios de diseño incluyen la determinación de la longitud adecuada para abarcar la distancia entre el C-terminal de una cadena y la N-terminal de la otra, en donde el enlazador generalmente está formado por pequeños residuos hidrófilos de aminoácidos que no tienden a enrollarse o formar estructuras secundarias. Tales métodos han sido descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense. Nos. 5,091,513 y 5,132,405 para Huston *et al.*; y Patente Estadounidense. No. 4,946,778 para Ladner *et al.*

En este respecto, el primer paso general del diseño de enlazador implica la identificación de sitios plausibles a enlazarse. Sitios de unión adecuados en cada uno de los dominios de polipéptido V_H y V_L incluyen aquellos que resultan la mínima pérdida de residuos de los dominios de polipéptido y que requieren un enlazador que comprende un número mínimo de residuos consistentes con la necesidad de estabilidad de la molécula. Un par de sitios define una “abertura” a ser unida. Enlazadores que conectan el C-terminal de un dominio con el N-terminal del siguiente por lo general comprenden aminoácidos hidrófilos que asumen una configuración no estructurada en soluciones fisiológicas y preferiblemente son libres de residuos que tienen grupos laterales grandes que podrían interferir con el pliegue adecuado de las cadenas V_H y V_L. Por lo tanto, los enlazadores adecuados bajo la invención generalmente comprenden cadenas polipeptídicas de alternancia de conjuntos de glicina y residuos de serina, y pueden incluir ácido glutámico y residuos de lisina insertados para mejorar la solubilidad. Secuencias de nucleótidos que codifican tales radicales enlazadores se pueden proporcionar fácilmente utilizando distintas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica.

Por otra parte, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal murina y un fragmento de región variable (falta del sitio de unión de antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y aún diseñados incluyen los que se describen en Riechmann *et al.* (Nature 332:323, 1988), Liu *et al.* (PNAS 84: 3439, 1987), Larrick *et al.* (Bio technology 7: 934, 1989) y Winter y Harris (TIPS 14: 139, mayo de 1993).

Un método para la producción de un anticuerpo humano comprende inmunizar a un animal no humano, tal como un ratón transgénico, con un antígeno objetivo, mediante lo cual se generan anticuerpos dirigidos contra el antígeno objetivo en dicho animal. Se han desarrollado procedimientos para la generación de anticuerpos humanos en animales no humanos. Los anticuerpos pueden ser parcialmente humanos, o preferiblemente completamente humanos. Los animales no humanos (tales como ratones transgénicos) en donde se ha introducido el material genético de codificación de una o más cadenas de inmunoglobulina humana pueden ser empleados. Estos ratones transgénicos se pueden alterar genéticamente en una variedad de formas. La manipulación genética puede resultar en cadenas de polipéptido de inmunoglobulina humana que reemplazan cadenas de inmunoglobulina endógena en por lo menos algunos anticuerpos (preferiblemente prácticamente todos) producidos por el animal durante la inmunización. Anticuerpos producidos por inmunizar a los animales transgénicos con un antígeno objetivo se proporcionan en el presente documento.

ES 2 355 916 T3

Ratones en los que uno o más genes de inmunoglobulina endógena son inactivados por varios medios se han preparado. Los genes de inmunoglobulina humana se han introducido en los ratones para reemplazar los genes de ratón inactivados. Anticuerpos producidos en los animales incorporan cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina humana codificadas por el material genético humano introducido en el animal. Ejemplos de técnicas para la producción y el uso de tales animales transgénicos se describen en las Patentes de Estados Unidos. 5,814,318, 5,569,825 y 5,545,806.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por procedimientos convencionales, por ejemplo, por inmortalización de células del bazo cosechadas del animal transgénico después de completar el calendario de inmunización. Las células del bazo pueden ser fusionadas con células de mieloma para producir hibridomas, por procedimientos convencionales.

Un método para producir una línea de célula de hibridoma que comprende inmunizar tal animal transgénico con un inmunógeno que comprende al menos siete residuos de aminoácido contiguos de un antígeno objetivo; recolectar células del bazo a partir del animal inmunizado; fusionar las células del bazo recolectadas a una línea de células de mieloma, con ello generando células de hibridoma; e identificar una línea de célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un antígeno objetivo. Tales líneas de células de hibridoma, y anticuerpos monoclonales producidos a partir de estos, están abarcados por la presente invención. Los anticuerpos monoclonales secretados por la línea de células de hibridoma son purificados por técnicas convencionales.

En otra modalidad, fragmentos de anticuerpo se producen por selección de un repertorio de anticuerpo que despliega fago no inmune contra una serie de antígenos en la presencia de una serie de competencia de antígenos (Stausbol-Grøn, B., *et al.*, De novo identification of cell-type specific antibody-antigen pairs by phage display subtraction. Isolation of a human single chain antibody fragment against human keratin 14. Eur J Biochem 2001 Mayo; 268(10): 3099-107). Este procedimiento se puede usar para producir anticuerpos del fago dirigidos contra los antígenos objetivo. El protocolo en general se basa en el descrito por Stausbol-Grøn, B., *et al.*, 2001. Brevemente, se usa un repertorio de anticuerpo que despliega fago semisintético no inmunizado. El repertorio es un repertorio fagémido de cadena Fv única (ScFv) construido reclonando las regiones de cadena pesada y ligera de la biblioteca lox (Griffiths, A.D., *et al.* (1994). Aislamiento de anticuerpos humanos de alta afinidad directamente de repertorios sintéticos grandes. EMBO J. 13, 3245-3260.). TG1 de *Escherichia coli* (supE hsdD5 Δ (lac-proAB) thi F' {traD36 proAB+ lacIq lacZ Δ M15}) es una cepa de supresor ámbar (supE) y se usa para propagación de partículas de fago. HB2151 de *E. coli* (ara Δ (lac-proAB) thi F' {proAB+ lacIq lacZ Δ M15}) es una cepa no de supresor y se usa para expresión de scFv soluble. En otra modalidad, una biblioteca de cadena Fv única humana (scFv) se puede amplificar y rescatar, como se describe (Gao, *et al.*, Making chemistry selectable by linking it to infectivity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, pp. 11777-11782, Octubre 1997). La biblioteca se desplaza contra los antígenos suspendidos en PBS (10 mM de fosfato, 150 mM de NaCl, pH 7.4) y los fagos scFv positivos se seleccionan por ensayo inmunosorbente enlazado a la enzima (ELISA).

En otras modalidades preferidas, se suministra un anticuerpo proporcionando un vector de expresión que codifica un anticuerpo recombinante, preferiblemente un anticuerpo Fv de cadena única.

Ejemplo 1

La figura 1 es un diagrama esquemático 100 de una sección transversal de una pared celular de levadura, que muestra de afuera hacia dentro, una capa fibrilar externa 110, una capa de manoproteína externa 120, una capa de beta glucano 130, una capa de beta glucano - capa de quitina 140, una capa de manoproteína interna 150, la membrana de plasma 160 y el citoplasma 170.

Preparación de Partículas WGP

Partículas de Glucano Enteras (WGP, Lot W0282) son previamente obtenidas de Alpha-Beta Technology. En general, Partículas de Glucano Enteras se preparan a partir de células de levadura por extracción y purificación de la fracción de glucano insoluble en álcali a partir de las paredes celulares de levadura. Las células de levadura se tratan con una solución de hidróxido acuosa sin interrumpir las paredes celulares de levadura, las cuales digieren la proteína y porción intracelular de la célula, dejando al componente de la pared de glucano desprovisto de contaminación de proteína significativa, y que tiene sustancialmente la estructura de pared celular inalterada de glucanos enlazados β (1-6) y β (1-3). Las células de levadura (*S. cerevisiae* cepa R4) se hacen crecer a fase Midlog en un medio mínimo bajo condiciones de fermentación de lote alimentado. Las células (~90 g de peso de célula en seco/l) se recolectan por centrifugación de lote a 2000 rpm durante 10 minutos. Las células. Las células después se lavan una vez en agua destilada y después se resuspenden en 1 litro de NaOH 1M y se calientan a 90 grados Celsius. La suspensión celular se agita vigorosamente durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble, que contiene las paredes celulares se recuperan por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material después se suspende en 1 litro, NaOH 1M y se calienta nuevamente a 90 grados Celsius. La suspensión de agita vigorosamente durante 1 hora a esta temperatura. La suspensión después se deja enfriar a temperatura ambiente y se continúa la extracción por unas 16 horas adicionales. El residuo insoluble se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material finalmente se extrae en 1 litro de agua llevada a pH 4.5 con HCl, a 75 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se recupera por

ES 2 355 916 T3

centrifugación y se lava tres veces con 200 mililitros de agua, cuatro veces con 200 mililitros de isopropanol y dos veces con 200 mililitros de acetona. La suspensión resultante se coloca en bandejas de vidrio y se secan a 55 grados Celsius bajo presión reducida para producir 7.7 g de un polvo blanco fino.

5 Una descripción más detallada de partículas de glucano enteras y un proceso para prepararlas se pueden encontrar en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,810,646; 4,992,540; 5,028,703; 5,607,677 y 5,741,495. Por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,028,703 describe que las partículas WGP de levadura se pueden producir de células de levadura en cultivo de fermentación. Las células se recolectan por centrifugación de lote a 8000 rpm durante 20 minutos en un centrifugador Sorval RC2-B. Las células después se lavan dos veces en agua destilada para prepararlas para la extracción del glucano entero. La primera etapa involucra resuspensión de la masa celular en 1 litro de NaOH al 4% p/v y se calienta a 100 grados Celsius. La suspensión celular se agita vigorosamente durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos. Este material después se suspende en 2 litros de NaOH al 3% p/v y se calienta a 75 grados Celsius. La suspensión se agita vigorosamente durante 3 horas a esta temperatura. La suspensión después se deja enfriar a temperatura ambiente y la extracción se continúa por unas 16 horas adicionales. El residuo insoluble se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos. Este material finalmente se extrae en 2 litros de NaOH al 3% p/v llevado a pH 4.5 con HCl, a 75 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se recupera por centrifugación y se lava tres veces con 200 mililitros de agua, una vez con 200 mililitros de etanol deshidratado y dos veces con 200 mililitros de éter de etilo deshidratado. La suspensión resultante se coloca en placas de petri y se secan.

20

Preparación de Partículas YGMP

Se suspende *S. cerevisiae* (100 g de levadura para hornear Fleishmans) en 1 litro de NaOH 1M y se calienta a 55 grados Celsius. La suspensión celular se mezcla durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material después se suspende en 1 litro de agua y se lleva a pH 4-5 con HCl, y se incuba a 55 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se recupera por centrifugación y se lava una vez con 1000 mililitros de agua, cuatro veces con 200 mililitros de isopropanol deshidratado y dos veces con 200 mililitros de acetona. La suspensión resultante se coloca en una bandeja de vidrio y se seca a temperatura ambiente para producir 12.4 g de un polvo ligeramente blancuzco, fino.

30

Preparación de Partículas YGMP

Se suspende *S. cerevisiae* (75 g de SAF-Mannan) en 1 litro de agua y se ajusta a pH 12-12.5 con NaOH 1M, y se calienta a 55 grados Celsius. La suspensión celular se mezcla durante 1 hora a esta temperatura. El material insoluble que contiene las paredes celulares se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material después se suspende en 1 litro de agua y se lleva a pH 4-5 con HCl, y se incuba a 55 grados Celsius durante 1 hora. El residuo insoluble se recupera por centrifugación y se lava una vez con 1000 mililitros de agua, cuatro veces con 200 mililitros de isopropanol deshidratado y dos veces con 200 mililitros de acetona. La suspensión resultante se coloca en una bandeja de vidrio y se seca a temperatura ambiente para producir 15.6 g de un polvo ligeramente blancuzco, fino.

40

Preparación de Partículas YCP

45 Células de levadura (*Rhodotorula sp.*) derivadas de cultivos obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) se hacen crecer aeróbicamente s fase estacionaria en YDP a 30 grados Celsius. Cultivos de *Rhodotorula sp.* disponibles de ATCC incluyen Nos. 886, 917, 9336, 18101, 20254, 20837 y 28983. Las células (1 l) se recolectan por centrifugación de lote a 2000 rpm durante 10 minutos. Las células después se lavan una vez en agua destilada y después se resuspenden en agua llevada a pH 4.5 con HCl a 75 grados Celsius durante 1 hora. El material insoluble que contiene las paredes celulares se recuperan por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. Este material después se suspende en 1 litro de NaOH 1M y se calienta a 90 grados Celsius durante 1 hora. La suspensión después se deja enfriar a temperatura ambiente y la extracción se continúa por unas 16 horas adicionales. El residuo insoluble se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos y se lava dos veces con 1000 mililitros de agua, cuatro veces con 200 mililitros de isopropanol y dos veces con 200 mililitros de acetona. La suspensión resultante se coloca en una bandeja de vidrio y se seca a temperatura ambiente para producir 2.7 g de un polvo ligeramente marrón, fino.

55

La figura 2 es un diagrama de la estructura de una partícula de pared celular de levadura; la figura 2B es una fotomicrografía fluorescente que muestra teñido concanavalina-A-FITC (isocianato de con-A-fluoresceína, Sigma Chemical, St. Louis, MO) del componente manano de las partículas de la pared celular de levadura; la figura 2C es un diagrama de la estructura de una partícula beta glucano-manano YGMP, la figura 2D es una fotomicrografía fluorescente que muestra teñido con-A-FITC acentuado de una partícula beta glucano-manano YGMP; la figura 2E es un diagrama de la estructura de una partícula beta glucano YGP y la figura 2F es una micrografía fluorescente que muestra la ausencia de teñido con-A-FITC de una partícula de beta glucano YGP.

65

La concanavalina A es una lecitina que se une selectivamente a manosa. La unión de concanavalina A se evalúa por microscopio fluorescente para observar la cantidad y distribución del patrón de manano en la superficie de varias preparaciones de pared celular de levadura. Las suspensiones de levadura para hornear (levadura para hornear Fleish-

ES 2 355 916 T3

mans), YGMP y YGP en PBS + 1 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂ se preparan a una densidad de 1 x 10⁸ partículas/ml. La base con-A-FITC es 1 mg/ml de concanavalina A-FITC en PBS + 1 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂. Se preparan las mezclas de etiquetado en tubos de microcentrifugador que consisten de:

- 5 100 μl de PBS + 1 mM de MgCl₂ + 1 mM de CaCl₂
- 2.5 μl de suspensión de partícula de pared celular de levadura
- 2.5 μl de solución base con-A-FITC.

10

Los tubos de microcentrifugador que contienen las mezclas de etiquetado se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante una hora. Las partículas de pared celular de levadura se recolectan por centrifugación (10,000 rpm durante 10 minutos) seguido por lavado de la pelotilla con 100 μl de PBS tres veces. Las partículas de pared celular de levadura lavadas se resuspenden en 100 μl de PBS y se transfieren a una placa de 96 cavidades para examen con un microscopio fluorescente. Las fotografías de campos ejemplares se muestran en las figuras 2B, 2D y 2F.

15

La tabla 1 resume los resultados de análisis de la composición química de partículas WGP, partículas YGP, partículas YGMP y partículas YCP que se preparan como se describe anteriormente. Nótese que las partículas YGP y partículas YGMP tienen beta-glucano bajo y proteína elevada comparado a las partículas WGP de la técnica anterior. Las partículas YGMP tienen un contenido de manano sustancialmente elevado comparado a los otros tipos de partículas. Las partículas YCP tienen un contenido de quitina + quitosina sustancialmente elevado comparado a los otros tipos de partícula.

25

Tabla 1					
Composición Química de Materiales de Pared Celular de Levadura					
Analito	Método	WGP S. cerevisiae	YGMP S. cerevisiae	YGP S. cerevisiae	YCP Rhodotorula
Composición Macromolecular*					
Proteína	Kjeldal	<1	4.5	4.9	-
Grasa	Hidrólisis de base, extracción Soxhlet	<1	1.6	1.4	-
Ceniza	Combustión	1.2	1.9	1.6	-
Composición de Carbohidrato**					
Beta-Glucano	Hidrólisis Enzimática	90.3	41.9	77	6.5
Quitina + quitosán (como glucosamina, n- acetil glucosamina)	Monosac Análisis-Dionex	2.1	2.3	2.4	68
Manano (como manosa)	Monosac Análisis-Dionex	<1	36.9	0.47	1.3
Otros Glucanos (como sin beta 1,3- glucosa y otros azúcares no medidos)	Monosac Análisis-Dionex	6.2	10.9	11.2	0.2
*Resultados reportados en % p/w de materiales analizados secos					
**Resultados reportados en % p/w de carbohidrato					
WGP - Partícula de Glucano Entero - Tecnología de la Técnica Anterior					
YGMP - Partícula Glucano-Manano de Levadura					
YGP - Partícula de Glucano de Levadura					
YCP -Partícula de Quitina de Levadura					

65

ES 2 355 916 T3

Ejemplo 2

Volumen Hidrodinámico de Partículas de Pared Celular de Levadura

5 Se determinó el volumen hidrodinámico de partículas de pared celular de levadura como una medición de la capacidad de carga útil de las partículas. Se pesó 1 g de una alícuota de partículas de pared celular de levadura en un tubo de centrifugador de 15 ml en tara para determinar el peso de las partículas secas. Se agrega agua (125 ml) al tubo, y el tubo se sometió a vórtice para mezclar la suspensión de partículas de pared celular de levadura. Las partículas se dejaron hincharse y absorber agua durante 30 minutos. La suspensión de partícula se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se removió agua, el tubo se pesó y se calculó el peso del agua absorbida. Se calculó el volumen hidrodinámico como la proporción del peso de agua absorbida al peso de las partículas secas. La tabla 2 presenta los resultados para dos preparaciones de WGP y YGP y YGMP de la técnica anterior de la presente invención.

15

Tabla 2	
Volumen Hidrodinámico de Preparaciones de Pared Celular de Levadura	
Ejemplar	
Partícula de Pared Celular de Levadura	Volumen Hidrodinámico (g de agua/g de partículas)
WGP Prep 1	9.7
WGP Prep 2	6.9
YGP	8.3
YGMP	6.7

20

25

30 El volumen hidrodinámico inferior de WGP Prep 2 puede ser debido a un número incrementado de partículas fragmentadas en esta preparación. Con respecto a las otras partículas, el YGP “puro” tiene un volumen hidrodinámico mayor que el YGMP.

35 En general, el volumen de carga útil se limita a < 66% de volumen hidrodinámico para asegurar cantidades de absorción de la carga útil por las partículas de pared celular de levadura. Por esta regla, $\leq 5.5 \mu\text{l}$ de carga útil puede ser cargada por mg de partículas de YGP y $\leq 4.4 \mu\text{l}$ de carga útil puede ser cargada por mg de partículas de YGMP.

40 Ejemplo 3

Biodisponibilidad Oral de YGP y YGMP

45 Se preparan partículas de glucano de levadura fluorescentemente etiquetadas (YGP-F) y partículas de glucano-manano de levadura fluorescentemente etiquetadas (YGMP-F) para un estudio de absorción. Los materiales de partida son 5 ml YGP (5 mg/ml en amortiguador de borato 0.1M, pH 8), 5 ml YGMP (5 mg/ml en amortiguador de borato 0.1M, pH 8), diclorotriazinil aminofluoresceína (DTAF), 20 mg/ml en DMSO, recientemente preparado y amortiguador de borato 0.1M, pH 8.

50 Se llevaron a cabo reacciones de etiquetado a una escala de 25 mg. Se suspendieron alícuotas de 25 mg de partículas en 5 ml de amortiguador de borato 0.1M, pH 8 y se sonicaron para reducir grupos de partículas a partículas únicas. Las partículas se centrifugaron y resuspendieron en 5 ml de amortiguador de borato 0.1M, pH 8. Se agrega DTAF (05 ml 20 mg/ml) a las partículas resuspendidas e incubadas durante 2 días a 37 grados Celsius. Al final de la incubación, se agrega 5 ml de amortiguador Tris 1M, pH 8.3 y la mezcla se incubó 30 minutos para apagar DTAF. Las partículas incubadas se centrifugaron y se lavaron en PBS hasta los sobrenadantes ya no son fluorescentes. Las partículas lavadas se resuspendieron en PBS a 5 mg/ml. Se cuantificó el número de partículas en una dilución 1:100 de una alícuota. Resultados: las partículas de pared celular de levadura intensamente fluorescentes se producen a concentraciones de 1.8×10^9 partículas por ml de YGP-F y 2.1×10^9 partículas por ml de YGMP-F.

60 La influencia de la composición de carbohidrato de superficie en la biodisponibilidad oral de partículas de glucano de levadura se estudió para determinar si la absorción de partícula fagocítica de una carga útil puede ser dirigida vía el receptor de manosa así como también por los receptores beta glucano CR3/dectina-1. La disponibilidad para dirigir cualquiera o ambos receptores puede expandir la población objetivo de las células más allá de macrófagos y células dendríticas.

65 Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 3, posterior. Materiales de partida incluidos: partículas de glucano de levadura etiquetadas con FITC (YGP-F), partículas de glucano-manano de levadura etiquetadas con FITC (YGMP-F), un grupo de siete ratones C57Black y un grupo de siete ratones C57/B16. Se prepararon dosis de YGP-F (1 mg/ml)

ES 2 355 916 T3

y YGMP-F (3.7 mg/ml) para suministrar un número equivalente de partículas en 0.1 ml de PBS y se administra por sonda nasogástrica a un ratón de cada grupo diariamente durante cinco días. La misma dosis se administra por inyección subcutánea de 0.1 ml a un ratón de cada grupo diariamente durante cinco días. En el día cuatro las cajas se cambiaron y se proporcionó un lecho fresco. Se recolectaron las pelotillas fecales en el día 5 de cada grupo en 15 ml de tubos cónicos y se congelan para procesamiento posterior. Las pelotillas fecales se procesaron agregando 5 ml de agua y mantuvieron a 4 grados Celsius durante 2 horas. Las pelotillas fecales hidratadas se homogenizaron usando un homogenizador Polytron. Se colocaron las diluciones de las heces homogenizadas en una placa microtituladora de 96 cavidades y microscópicamente examinadas bajo condiciones de luz blanca transmitida y fluorescente para la presencia de partículas fluorescentes. Las alícuotas que tienen partículas fluorescentes se diluyen adicionalmente y se cuantificó el número de partículas fluorescentes/ml con un hematocitómetro.

Los ratones se sacrificaron en el día 7, y el bazo se removió de cada animal y se colocaron en tubos separados que contienen PBS en hielo. Los bazos se maceraron con tijeras y se presionaron hasta 70 micrones de tamiz para producir suspensiones de célula única. Se retuvieron alícuotas de las suspensiones de célula única y fijaron en 1% de formalina en PBS para cuantificar la fracción de células etiquetadas con partículas fluorescentes usando FACS. Las suspensiones celulares se tiñen usando un anticuerpo etiquetado con ficoeritrina (PE) contra marcador de macrófago, preferiblemente Emr-1(F4/80) murina, el cual tiñe macrófagos de pulpo rojo esplénico, células Kupffer, microglía y células Langerhans.

Las suspensiones celulares se colocan en placas a una densidad de 10^7 células por 60 mm en caja de petri en DMEM que contiene 10% de suero de bovino fetal (JRH Scientific), penicilina-estreptomicina y glucamina (Gibco) y se incubaron durante 24 horas a 37 grados Celsius bajo CO_2 al 5% para permitir la unión. Después de la incubación, cualquiera de los linfocitos no unidos se lavan. Las células de macrófago esplénico unido se tripsinizaron, fijaron y registraron para la fracción de células adherentes que tienen partículas fluorescentes usando un microscopio fluorescente.

La administración de las partículas fluorescentes es bien tolerada. El análisis de macrófagos esplénicas adherentes demostró la presencia de partículas de pared celular fluorescente en animales tratados con partículas fluorescentes. Estos resultados demostraron que tanto YGP-F y YGMP-F están oralmente biodisponibles y pueden ser sistemáticamente distribuidos por macrófagos. En análisis de las heces demuestran la presencia de partículas fluorescentes, indicando que la absorción oral está incompleta en los niveles de dosificación usados. Los ratones C57/B16 son capaces de absorber YGP-F y YGMP-F administrados oralmente. El número de partículas fluorescentes en heces se cuantificó como un estimado de eficiencia de absorción.

35

Tabla 3							Presencia de Partículas Fluorescentes	
Ruta	Tratamiento	Dosis	mg/ml	# part./ml	# part./dosis	Macrófagos esplénicos	Heces	
	Control	PBS control	-	-	-			
SQ	YGP-F	100 Pg	1	1×10^9	1×10^8	+	-	
Oral	YGP-F	100 Pg	1	1×10^9	1×10^8	+	+	
Oral	YGP-F	33 Pg	0.33	3.3×10^8	3.3×10^7	+	+	
SQ	YGPM-F	370 Pg	3.7	1×10^9	1×10^8	+	-	
Oral	YGPM-F	370Pg	3.7	1×10^9	1×10^8	+	+	
Oral	YGPM-F	110 Pg	1.1	3.3×10^8	3.3×10^7	+	+	
Control No tratado	-	-	-	-	-	-	-	

55

Ejemplo 4

60

Preparación de Partículas YGP Cargadas con Quitosán

65

Se prepararon partículas YGP con un polímero de captura catiónico, quitosán. Se prepararon soluciones de quitosán 1% p/v en ácido acético 0.1M usando ya sea quitosán de Peso Molecular Alto (APM) (~70,000 Pm, Sigma Chemical St. Louis, Mo) o quitosán de Peso Molecular Bajo (BPM) (~ 10,000 Pm, Sigma Chemical St. Louis, Mo). Ambas soluciones de quitosán APM como BPM al 1% se prepararon en ácido acético 0.1M. Se agrega 4 ml de solución de quitosán APM o BPM a 2 g de YGP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml y se mezcló hasta que se formó una pasta suave. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir que el líquido sea absorbido.

ES 2 355 916 T3

Se agrega NaOH (40 ml, 0.1M) a cada tubo, el cual sometió a vórtice inmediatamente para precipitar el quitosán dentro de YGP. La suspensión YGP:quitosán se pasó a través de una aguja de calibre 18 para producir una suspensión fina de partículas YGP:quitosán. Las partículas YGP:quitosán se recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos) seguido por lavado de la pelotilla con agua desionizada hasta que el pH del sobrenadante fue 7-8. Las partículas YGP:quitosán después se lavaron cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:quitosán después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 1.2 g de partículas de quitosán YGP:BPM y 1.4 g de partículas de quitosán YGP:APM.

10 Ejemplo 5

Preparación de Partículas YGP Cargadas con CytoPure™

15 Se prepararon partículas YGP con un polímero de captura catiónico biodegradable, CytoPure™, un reactivo de transfección polimérico catiónico soluble en agua, comercialmente disponible, propietario (Qbiogene, Inc., CA). Se diluyó veinte ml de CytoPure™ en 0.5 ml de agua desionizada y se agrega 0.5 g de YGP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml y se mezcló hasta que se formó una pasta suave. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 4 grados Celsius para permitir que el líquido sea absorbido. Se agrega veinticinco ml de etanol a cada tubo, el cual sometió a vórtice inmediatamente para precipitar el CytoPure™ dentro de YGP. La suspensión YGP:CytoPure™ se sonicó para producir una suspensión fina de partículas YGP:CytoPure™. Las partículas YGP:CytoPure™ se recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos) seguido por lavado de la pelotilla cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:CytoPure™ después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 0.45 g de partículas de YGP:CytoPure™.

Ejemplo 6

30 *Preparación de Partículas YGP Cargadas con Polietilamina*

Se prepararon partículas YGP con polietileniimina (PEI) como un polímero de captura catiónico. Se agrega una alícuota 0.5 ml de una solución PEI al 2% p/v (~50,000 Pm, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en agua a 0.5 g de YGP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml y se mezcló hasta que se formó una pasta suave. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir que el líquido sea absorbido. Se agrega veinticinco ml de etanol a cada tubo, el cual sometió a vórtice inmediatamente para precipitar el PEI dentro de YGP. La suspensión YGP:PEI se pasó a través de una aguja de calibre 18 para producir una suspensión fina de partículas YGP:PEI. Las partículas YGP:PEI se recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos) seguido por lavado de la pelotilla cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:PEI después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 0.48 g de partículas TGP:PEI.

Ejemplo 7

45 *Preparación de Partículas YGP Cargadas con Alginato*

Se prepararon partículas YGP con alginato (F200 o F200L, Multi-Kem Corp., Ridgefield, NJ) como un polímero de captura catiónico. Se agrega una alícuota de 2 ml de una solución de alginato al 1% p/v en agua a 1 g de YGP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml y se mezcló hasta que se formó una pasta suave. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para permitir que el líquido sea absorbido. La mezcla después se diluyó con 40 ml de una solución acuosa de cloruro de calcio al 1% p/v. La suspensión YGP:alginato se pasó a través de una aguja de calibre 18 para producir una suspensión fina de partículas YGP:alginato. Las partículas YGP:alginato se recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos). Las partículas de YGP:alginato se lavaron cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:alginato después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 0.95 g de partículas TGP:alginato F200 y 0.86 g de partículas YGP:alginato F200.

60 Ejemplo 8

Preparación de Partículas YGP y YGMP Cargadas con Poli-L-lisina

Se prepararon partículas YGP y YGMP con Poli-L-lisina (PLL) como un polímero de captura. Se agrega una alícuota de 4 ml de una solución PLL al 1% p/v (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en agua a 1 g de YGP o YGMP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 55 grados Celsius para permitir que el líquido sea absorbido. Se agrega diez ml de etanol a cada tubo, el cual se homogenizó (homogenizador Polytron) para producir una suspensión fina de partículas YGP:PLL o YGMP:PLL. Las partículas YGP:PLL o YGMP:PLL se

ES 2 355 916 T3

recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos). Las YGP:PLL o YGMP:PLL se lavaron cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:PLL o YGMP:PLL después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 1.3 g de partículas TGP:PLL y 1.1 g de partículas YGMP:PLL. La evaluación en microscopio no mostró agregados de PLL libres, únicamente partículas YGP:PLL o YGMP:PLL.

Ejemplo 9

Preparación de Partículas YGP o YGMP Cargadas con Xantano

Se prepararon partículas YGP o YGMP con xantano como un polímero de captura catiónico. Se agrega una alícuota de 4 ml de una solución de xantano al 1% p/v en agua, se calentó a 55 grados Celsius para reducir la viscosidad y se agrega a 1 g de YGP o YGMP en un tubo centrifugador cónico de 50 ml. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 55 grados Celsius. Se agrega diez ml de etanol a cada tubo, el cual se homogenizó (homogenizador Polytron) para producir una suspensión fina de partículas YGP:xantano o YGMP:xantano. Las partículas YGP:xantano o YGMP:xantano se recolectaron por centrifugación (2,000 rpm durante 10 minutos). Las partículas YGP:xantano o YGMP:xantano se lavaron cuatro veces con dos volúmenes de pelotilla de isopropanol y después se lavaron dos veces con dos volúmenes de pelotilla de acetona. Las partículas YGP:xantano o YGMP:xantano después se secaron a temperatura ambiente en una capucha. El procedimiento proporcionó 1.2 g de partículas TGP:xantano y 1.1 g de partículas YGMP:xantano. La evaluación en microscopio no mostró agregados de xantano libres, únicamente partículas YGP:xantano o YGMP:xantano.

Ejemplo 10

Evaluación de la Capacidad de YGP:Quitósán y YGP:Alginato Para Unir Tintes Cargados

Se prepararon partículas YGP:Quitósán y YGP:Alginato como se describe en los Ejemplos 7 y 9 anteriores. Se prepararon soluciones acuosa al 0.1% p/v de tripano azul (Benzamina azul; CI 23850), un tinte aniónico y xileno cianol (ácido azul, un tinte catiónico). Se agrega una alícuota de 50 μ l de una solución de tinte acuosa al 0.1% p/v a 10 mg de YGP, YGP:quitósán o YGP:Alginato en tubos de microcentrifugador y la mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las pelotillas se lavaron con agua desionizada hasta que las soluciones del sobrenadante ya no está coloreadas. Se evaluó el color de las pelotillas; los resultados se representan en la Tabla 4, posterior.

Formulación YGP	Color de Pelotilla	
	Tripano azul	Xileno cianol
YGP	Bronceado	Bronceado
YGP: Quitósán	Azul	Bronceado
YGP: Alginato	Bronceado	Verde

Las interacciones electroestáticas entre polímeros de captura insolubles dentro de YGP son capaces de unir a cargas útiles de tinte del modelo de peso molecular bajo, opuestamente cargados.

Ejemplo 11

Uso de YGP:Agarosa para Capturar Moléculas por Atrapamiento Físico

Se prepara YGP:Agarosa para evaluar el atrapamiento físico como un medio para capturar una carga útil en YGP. Se prepara una solución de agarosa al 2% p/v (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en TE, y se enfrió a 50 grados Celsius. Se diluyó 1 mg/ml de una solución base de ADN de esperma de salmón en TE a 0.5 mg/ml de ADN en TE o en 1% de agarosa a 50 grados Celsius. Se mezcló una alícuota de 500 mg de YGP con 500 μ l de ADN en TE o 500 μ l de ADN en agarosa a 50 grados Celsius y la mezcla se incubó 1 hora a 50 grados Celsius. La mezcla después se enfrió durante 1 hora en un refrigerador para solidificar la agarosa. Después de 1 hora, se agrega 10 ml de TE y la mezcla se incubó durante la noche en el refrigerador. La mezcla después se centrifugó, y se midió el ADN en el sobrenadante por absorción a 260 nm. Se retuvo aproximadamente >80% del ADN aplicado por YGP:Agarosa comparado a <1% retenido por el control YGP:TE. Estos resultados indican que la agarosa efectivamente atrapa ADN dentro de YGP por atrapamiento físico.

ES 2 355 916 T3

Ejemplo 12

Uso de YGP:Poliacrilamida para Capturar Moléculas por Atrapamiento Físico

5 Se prepara YGP:Poliacrilamida para evaluar el atrapamiento físico como un medio para capturar una carga útil en YGP. Se diluyó 1 mg/ml de una solución base de ADN de esperma de salmón en TE a 0.5 mg/ml de ADN en TE o en 30% de poliacrilamida/bis (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO). Se agrega TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) a cada mezcla de ADN (1 μ l de TEMED a 5 ml de solución de ADN), y se agrega una alícuota de 2 ml de cada solución a 1 g de YGP. Lo resultante se mezcló para formar una suspensión uniforme y se incubó 3 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación por 3 horas, se agrega 10 ml de TE y la mezcla se incubó durante la noche en un refrigerador. La mezcla después se centrifugó, y se midió el ADN en el sobrenadante por absorción a 260 nm. Se retuvo aproximadamente >95% del ADN aplicado por YGP:Poliacrilamida comparado a <1% retenido por el control YGP:TE. Estos resultados indican que la poliacrilamida es un polímero de captura efectivo de uso para capturar ADN dentro de YGP por atrapamiento físico.

Ejemplo 13

YGP Cargado con una Molécula Pequeña, Tetraciclina

20 Se cargó el antibiótico tetraciclina (tet) en YGP usando la insolubilidad relativa de la tetraciclina-sal de calcio. Las partículas de la pared celular de levadura usadas son YGP, YGP:alginato F200 y YGP:alginato F200L preparadas como se describe anteriormente. Las soluciones base son CaCl₂ 1M y 100 mg/ml de tetraciclina HCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las mezclas de carga se muestran en resumen en la Tabla 5, posterior.

30 **Tabla 5**

				Cargado			Liberado	
				A355*	% tet unido	% tet p/p	A355	
YGP (1 mg)	Tet (μ l)	Agua (μ l)	CaCl ₂ 1M (μ l)	super	unido	p/p	PBS	HCl 0.1M
-	-	-	200	0	-	-	-	-
-	4	200	-	0.538	-	-	-	-
-	4	-	200	0.542	-	-	-	-
YGP	-	-	200	0.01	-	-	-	-
YGP	4	200	-	0.56	0	-	-	-
YGP	4	-	200	0.524	<1	-	-	-
YGP-alginato F200	4	200	-	0.405	24.8	9.9	3.6	4.9
YGP-alginato F200L	4	200	-	0.375	30.3	12.1	5.9	12.2
				*1/100 dilución				

55 Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se agrega agua desionizada o CaCl₂ 1M como se indica. Después de 60 minutos a temperatura ambiente, las mezclas se sonicaron y se incubaron por al menos 30 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las mezclas después se centrifugaron (2,000 rpm durante 10 minutos) y se indicó la presencia de tetraciclina por el color amarillo de la pelletilla y del sobrenadante inicial. Se calcula la cantidad de tetraciclina cargada en las partículas de pared celular de levadura a partir de la pérdida de absorción a 355 nm, el pico del espectro de absorción de tetraciclina. Una dilución de 4 μ l de los 100 mg/ml de la solución base de tetraciclina HCl en 200 μ l de agua desionizada tiene una absorbancia a 355 nm de 0.538 comparada a un blanco de agua desionizada. La liberación de tetraciclina a partir de las partículas de paredes celulares de levadura cargadas en PBS o HCl 0.1 también se midió espectrofotométricamente.

65 Los resultados se resumen en la Tabla 5, anterior. En general, mientras las pelletillas YGP:alginato F200 y YGP:alginato F200L son amarillas después del lavado, las pelletillas YGP no son amarillas, indicando poco, si cualquier carga de tetraciclina ya sea como el clorhidrato o la sal de calcio en la ausencia de un polímero de captura. En contraste, la tetraciclina es efectivamente cargada y atrapada en formulaciones YGP:alginato F200 y YGP:alginato F200L, con aproximadamente 25-30% de la carga de tetraciclina aplicada absorbida como la sal de alginato de calcio.

ES 2 355 916 T3

La tetraciclina atrapada se libera a partir de YGP:alginato F200 y YGP:alginato F200L en HCl 0.1M. La tetraciclina atrapada es parcialmente retenida en YGP:alginato F200 y TGP:alginato F200L en PBS durante 1 hora a 37 grados Celsius, aproximadamente 26.5-51.6% de HCl 0.1M extraíble.

5 En resumen, la tetraciclina es fácilmente atrapada como un complejo de sal de alginato de calcio en una composición YGP-alginato de calcio, pero no es efectivamente cargada y retenida dentro de solo YGP. La tetraciclina atrapada como un completo alginato de calcio en YGP:alginato F200 y YGP:alginato F200L es lentamente liberada en PBS a 37 grados Celsius y sustancialmente liberada bajo condiciones ácidas.

10

Ejemplo 14

Eficacia de Tet y YGP:Tet Incrementando la Eliminación Microbiocida in vitro de Macrófagos J774

15 Se prepara YGP:alginato-Tet como se describe en el Ejemplo 13, anterior. Los números de partículas de YGP y YGP:alginato-tet por ml en soluciones base son 9×10^7 /ml y 6×10^8 /ml, respectivamente.

20

Tabla 6							
Eliminación de S.aureus por Macrófagos de Murina J774 Cargados con Partículas YGP							
Tubo YGP	J774 5×10^5 /ml	DMEM+C	YGP/tet 5×10^7 /ml	μ l	Partículas/ml	S. aureus Eliminada	Eliminación incrementada de pliegues
a	1 ml	0.1 ml	-	-	-	$< 1 \times 10^5$	1
b	-	1.1 ml	-	-	-	$< 1 \times 10^5$	1
c	1 ml	-	YGP	100	3×10^7	$< 1 \times 10^5$	1
d	-	1 ml	YGP	100	3×10^7	$< 1 \times 10^5$	1
e	1 ml	-	YGP:tet	100	3.75×10^6	1×10^8	100
f	-	1 ml	YGP:tet	100	3.75×10^6	1×10^6	-
g	1 ml	-	YGP:tet	100	7.5×10^6	$> 1 \times 10^8$	>10
h	-	1 ml	YGP:tet	100	7.5×10^6	1×10^7	-
i	1 ml	-	YGP:tet	100	1.5×10^7	$>1 \times 10^8$	-
j	-	1 ml	YGP:tet	100	1.5×10^7	$>1 \times 10^8$	-
k	1 ml	-	YGP:tet	100	3×10^7	$>1 \times 10^8$	-
l	-	1 ml	YGP:tet	100	3×10^7	$>1 \times 10^8$	-
m	1 ml	-	tet - 1.25	100	1.25 Pg/ml	1×10^6	-
n	-	1 ml	tet - 1.25	100	1.25 Pg/ml	1×10^6	1
o	1 ml	-	tet - 2.5	100	2.5 Pg/ml	1×10^7	3.3
p	-	1 ml	tet - 2.5	100	2.5 Pg/ml	3.3×10^6	-
q	1 ml	-	tet - 5	100	5 Pglml	$>1 \times 10^8$	-
r	-	1 ml	tet - 5	100	5 Pg/ml	$>1 \times 10^8$	-
s	1 ml	-	tet - 10	100	10 Pg/ml	$>1 \times 10^8$	-
t	-	1 ml	tet - 10	100	10 Pg/ml	$>1 \times 10^8$	-

60

Se combinó un ml de macrófagos de murina, J774 (5×10^5 ml) con YGP, YGP:alginato - tet o tetraciclina a concentraciones variadas como se resume en la Tabla 6, anterior.

65

Las células J774 se cultivan durante la noche en medio (DMEM que contiene 10% de suero de bovino fetal son antibióticos o glutamina). Los cultivos se incuban con medio solo, tetraciclina diluida en medio o partículas diluidas en medio durante 1 hora con rotación a 37 grados Celsius para permitir la fagocitosis de las partículas. El ensayo de eliminación microbiana se fija en placas de 96 cavidades. Los cultivos se diluyen en medio y se incuban durante la

ES 2 355 916 T3

noche para permitir el metabolismo y liberación de tet a partir de partículas YGP:alginato-tet fagocitadas. Se agrega estímulo bacteriana como se indica en la Tabla 6 y los cultivos se incuban 2 horas a 37 grados Celsius en una incubadora de CO₂ para permitir la fagocitosis y eliminación de *S. aureus* por los macrófagos de murina J774. Después de esta incubación, se agrega 200 µl de Caldo LB (Caldo Luria-Bertani: 1.0% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1.0% de NaCl) a cada cultivo para someter a lisis los macrófagos. Los cultivos se incuban a 37 grados Celsius en una incubadora para permitir la excrecencia de *S. aureus* que sobreviven. El crecimiento se monitorea por cambio en pH como se indica por fenoles rojo. Se comparan los efectos de YGP, YGP:alginato-tet o tetraciclina. Los resultados se proporcionan en las dos columnas derechas de la Tabla 6.

Aproximadamente 7.5×10^6 de partículas YGP:alginato-tet produce un efecto en macrófagos en apenas equivalente a aproximadamente 2.5 µg/ml de tetraciclina HCl. Los macrófagos solos son relativamente menos efectivos que los macrófagos tratados con tetraciclina en ya sea forma, y tan efectivo como los macrófagos tratados con solo YGP vacío. Los macrófagos en combinación con tetraciclina libre en solución no son mucho más efectivos que solo tetraciclina. Los macrófagos tratados con partículas YGP:alginato-tet muestran sinergia significativa. En general, los resultados demuestran que la fagosoma suministrada de tetraciclina en células de macrófago J774 mejora la capacidad de eliminación de células de macrófago J774 para *S. aureus*.

Ejemplo 15

Carga de Proteína en YGP

Se evalúa la utilidad del sistema de suministro de la presente invención para la retención, transporte y suministro de péptidos o proteínas terapéuticas, antígenos de vacuna u otros péptidos o proteínas usando las proteínas mezcladas de suero de bovino fetal. Las partículas de pared celular de levadura usadas son: YGP, YGP-PEI y YGP-quitosán preparadas como se describe anteriormente. Las soluciones base son 45 ng/µl de suero de bovino fetal (FCS) (Fetal Bovine Serum, JRH Biosciences, Lenexa, KS), 0.2% de PEI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en TE, amortiguador de fosfato 0.05 M, pH 7.2 (amortiguador P) y amortiguador de fosfato 0.05 M, pH 7.2, NaCl 1M (P + amortiguador de sal).

Se agregaron cuatro µl de FCS a 1 mg de YGP, YGP-P o YGP-CN en tubos de microcentrifugadora como se indica en la Tabla 7 y la mezcla resultante se incubó 60 minutos a temperatura ambiente para permitir al líquido ser absorbido por las partículas. Después de la incubación, 200 µl de amortiguador de fosfato o 200 µl de PEI son como se indica en la Tabla 7 y la mezcla resultante se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agrega 0.5 ml de amortiguador de fosfato, y después unos 5 minutos adicionales de incubación, los tubos se someten a sonicación para producir partículas únicas. Las partículas son formadas en pelotillas por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes se remueven a tubos nuevos. Se agrega 0.5 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.05M, pH 7.2 + NaHCl 1M a las pelotillas, y después de 5 minutos adicionales de incubación, los tubos se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos y se remueven los sobrenadantes de elución muy salina a tubos nuevos. Se mide el contenido de proteína de los sobrenadantes por absorbancia a 280 nm.

Tabla 7					
Tubo	YGP	1° Carga	2° Carga	Amortiguador P (µl)	Amortiguador P+Sal (µl)
1	-	4 PI FCS	Amortiguador P 200 µl	500	500
2	YGP	4 PI FCS	Amortiguador P 200 µl	500	500
3	YGP	4 PI FCS	PEI 2% 200 µl	500	500
4	YGP-PEI	4 PI FCS	Amortiguador P 200 µl	500	500
5	YGP-CN	4 PI FCS	Amortiguador P 200 µl	500	500

Los resultados de carga de proteína se muestran en la Tabla 8. Las partículas YGP sin una molécula de captura atrapan únicamente el 5% de la proteína presentada. Las partículas YGP que se cargan primero con proteína FCS y después se exponen a PEI retienen el 47% de la carga de proteína. Las partículas YGP que se precargan con un polímero de captura tal como PEI o quitosán antes de la exposición a la carga de proteína tal como 68% y 60% retenido, respectivamente de la carga de proteína.

ES 2 355 916 T3

Tabla 8							
Tubo	YGP	Carga útil	Polímero de Captura	Proteína no unida (ng)	% de Proteína no unida	Proteína unida (ng)	% de Proteína unida
1	-	FCS	Amortiguador P	180	100	-	-
2	YGP	FCS	Amortiguador P	180	95	10	5
3	YGP	FCS	2% de PEI	120	63	70	47
4	YGP-PEI	FCS	Amortiguador P	60	32	130	68
5	YGP-CN	FCS	Amortiguador P	80	40	120	60

Los resultados demuestran que las proteínas de suero no son efectivamente cargadas y atrapadas en YGP sin polímero de captura. Usando YGP que se precarga con polímeros de captura antes de la exposición a las proteínas de carga útil resultando en incremento de proteína atrapada. Alternativamente, las proteínas pueden ser atrapadas dentro de YGP primero cargando la proteína, y después agregando un polímero de captura soluble para secuestrar la proteína con la partícula.

Ejemplo 16

Comparación de Varios Métodos de ADN de Carga en YGP

Se evalúan varios métodos de carga de ADN de esperma de salmón de carga en YGP, YGP que contiene quitosán de peso molecular bajo (BPM) o YGP que contiene quitosán de peso molecular alto (APM).

a. Capilaridad de carga seguida por precipitación de etanol

Se divide ADN de esperma de salmón, (Signa, St. Louis, MO) por 40 pasos a través de agujas de calibre 18 y se diluye a una concentración de 0.1 mg/ml en TE 50 mM (Tris-HCl, pH 8, 2 mM de EDTA). Se determinan los volúmenes de carga de la solución de ADN y se mezcla en tubos de centrifugadora por duplicado con 100 mg de alícuotas de YGP, YGP:quitosán BPM o YGP:quitosán APM como en el Ejemplo 2 y se incuban durante 1 hora. Las mezclas incubadas son precipitadas de etanol agregando 1.5 ml de etanol a cada tubo. Los productos insolubles se recolectan por centrifugación a 2,000 rpm durante 10 minutos. Se agrega 10 ml de TE a cada tubo, incubado durante 1 hora a 37 grados Celsius, centrifugados a 2,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el YGP insoluble y se determina el contenido de ADN del sobrenadante por absorbancia a 260 nm. Se calcula la cantidad de ADN restante en el YGP.

b. Carga de ADN por absorción

Se mezclan los volúmenes de carga de la solución de ADN en tubos de centrifugadora por duplicado con 100 mg de alícuotas de YGP, YGP:quitosán BPM o YGP:quitosán APM como en el ejemplo 4a y se incuban durante 1 hora. Se agrega 10 ml de TE a cada tubo, incubado durante 1 hora a 37 grados Celsius, centrifugados a 2,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el YGP insoluble. Se determina el contenido de ADN del sobrenadante por absorbancia a 260 nm. Se calcula la cantidad de ADN restante en el YGP.

c. Carga de ADN por captura de CTAB

Se mezclan los volúmenes de carga de la solución de ADN en tubos de centrifugadora por duplicado con 100 mg de alícuotas de YGP, YGP:quitosán BPM o YGP:quitosán APM como en el ejemplo 4 y se incuban durante 1 hora. Las mezclas incubadas se precipitan agregando 1.5 ml de una solución de hexadeciltrimetilamonio bromuro al 2% (también conocido como bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB) a cada tubo. Se agrega 10 ml de TE a cada tubo, el cual se incubaba durante 1 hora a 37 grados Celsius y se centrifuga a 2,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el YGP insoluble. Se determina el contenido de ADN del sobrenadante por absorbancia a 260 nm. Se calcula la cantidad de ADN restante en el YGP.

ES 2 355 916 T3

Se calcula la cantidad de ADN restante en el YGP.

Los resultados se representan en la Tabla 9, posterior.

5

Tabla 9			
Método	% de ADN unido en YGP		
	YGP	YGP:quitosán BPM	YGP: quitosán APM
Carga Directa	<1 %	32%	70%
Carga Directa + Etanol	<1 %	No realizado	Not done
Carga Directa por captura de CTAB	>99%	>99%	99%
Carga por Absorción	<1 %	5%	12%

10

15

20

La carga o precipitación de ADN de muestra fallan para efectivamente cargar y capturar ADN en el YGP. En contraste, el uso del polímero de captura catiónico, quitosán, resulta en la formación de complejos quitosán-ADN que puede capturar ADN dentro de YGP. Además, el agente catiónico CTAB puede efectivamente ser usado para capturar ADN cargado en YGP.

25

Ejemplo 17

Carga y Captura de ADN

30

Se prepara ADN de esperma de salmón fluorescente mezclando 1 mg/ml de la solución de ADN de esperma de salmón en amortiguador de carbonato 0.1M, pH 9.2 con 100 µl de una suspensión de DTAF 1 mg/ml en amortiguador de carbonato 10 mM, pH 9.2. Después de la incubación durante la noche a 37 grados Celsius, se agrega 200 µl de Tris-HCL 1M, pH 8.3 y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se agregan 100 µl de NaCl 1M y 3 ml de etanol al ADN para precipitar el etanol. Después del almacenaje a -20°C durante la noche, se recolecta lo precipitado de etanol por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos. Lo precipitado de etanol se lava con etanol al 70% hasta que el sobrenadante es claro y se resuspende en 1 ml de TE.

35

40

Las suspensiones de YGP se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agrega 0.45 ml de etanol al 95% a una serie (YGP, YGP-P, YGP-quitosán) de tres tubos, se agrega 0.2 ml de PEIO al 2% a dos series de los tres tubos y se agrega 0.2 ml de CTAB al 2% a otra serie de tres tubos. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agrega 0.2 ml de CTAB al 2% a una serie de los tubos de PEI y la incubación prosigue por unos 30 minutos adicionales. Se agrega etanol (1 ml, 95%) y los YGP se almacenan durante la noche a -20 grados Celsius. Las suspensiones de YGP se lavan con etanol al 70% y se resuspenden en 0.5 ml de PBS. Los resultados se evalúan por microscopio fluorescente, y se muestran en la Tabla 10.

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

Tabla 10

Partícula	Tratamiento	Pelotilla YGP	Observación con Microscopio Fluorescente
YGP	etanol	Blanca	No fluorescente
YGP-CN	etanol	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna
YGP-P	etanol	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna
YGP	PEI al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna
YGP-CN	PEI al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna débil
YGP-P	PEI al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna débil
YGP	CTAB al CTAB	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna
YGP-CN	CTAB al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna fuerte
YGP-P	CTAB al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna fuerte
YGP	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna fuerte
YGP-CN	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna
YGP-P	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarilla	Fluorescencia de partícula interna

La captura no significativa de ADN etiquetado fluorescente ocurre si únicamente se usa precipitación de etanol simple sin un polímero de captura, lo que demuestra que la tecnología de la técnica anterior no es efectiva como un sistema de suministro de ADN. El ADN etiquetado fluorescente claramente es capturado por polímeros de captura catiónicos PEI o quitosán, o con el detergente catiónico CTAP dentro de las partículas YGP. La mejor captura de ADN ocurre cuando se usa una combinación de polímero de captura y CTAB, tal como YGP:PEI: ADN:CTAB; YGP:quitosán:ADN: CTAB, o YGP:ADN:PEI:CTAB.

Ejemplo 18

ADN de Plásmido Fluorescentemente Etiquetado Cargado y Capturado

Se prepara el plásmido pIRES que contiene YGP por transfección y expresión de EGFP codificado en células J774, línea celular derivada de macrófagos de murina. Los agentes de captura catiónicos usados incluyen polímeros catiónicos tales como polietilenimina (PEI), CytoPure™, un reactivo de transfección de polímero catiónico soluble en agua, comercialmente disponible, propietario (Qbiogene, Inc. CA) y un detergente catiónico hexadeciltrimetil-amoniobromuro (CTAB). Un PEI preferido es JetPEI, un reactivo de transfección polimérico catiónico de polietilenimina lineal comercialmente disponible (Qbiogene, Inc, CA).

pIRES-EGFP (Clontech, CA) contiene el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) del virus de encefalomiocarditis (ECMV) entre el MCS y la región codificante EGFP (proteína fluorescente verde intensificada). Esto permite tanto a los genes de interés (clonados en el MCS) como al gen EGFP ser traducidos de un ARNm bicostrónico único, pIRES-EGFP es diseñado para la selección eficiente (por citometría de flujo u otros métodos) de células de mamífero recientemente transfectadas que expresan EGFP y otras proteínas de interés. Para optimizar la selección de células que expresan niveles altos de la proteína de interés, pIRES-EGFP utiliza una secuencia IRES parcialmente discapacitada (1). Este IRES atenuado conduce a una proporción reducida de iniciación de traducción en el codón de partida EGFP en relación al gen clonado. Esto permite la selección de aquellas células en las cuales el ARNm y por lo tanto la proteína objetivo, se produce a niveles elevados para compensar una proporción subóptima de traducción de EGFP. Este vector también se puede usar para expresar EGFP solo o para obtener líneas celulares establemente transfectadas sin fármacos que consumen tiempo y selección clonal. EGFP es una variante que cambia a rojo de GFP de tipo nativo que se ha optimizado para fluorescencia brillante o expresión elevada en células de mamífero. (Máximo de excitación = 488 nm; máximo de emisión = 509 nm) EGFP codifica la variante GFPmut1, la cual contiene las sustituciones de aminoácido Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr. Estas mutaciones incrementan la brillantez y solubilidad de GFP, principalmente debido a propiedades de plegado de la proteína mejoradas y eficiencia en la formación de cromóforos. EGFP también contiene una estructura de lectura abierta compuesta al menos completamente de codones humanos preferidos. Esto conduce a la traducción más eficiente y, por lo tanto, niveles de expresión elevados en células eucarióticas, en relación a GFP de tipo nativo.

ES 2 355 916 T3

Las soluciones preparadas son: ADN de plásmido pIRES EGFP, 0,72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua, 0,2% p/v de PEI (Sigma) en TE, 2 μl de CytoPure (Qbiogen) + 48 μl de NaCl 0.15M, 2 μl de JetPEI (Qbiogene) + 48 μl de TE, 0,2% de Espermidina en TE, 2% de CTAB (ac) y salina amortiguada de fosfato (PBS).

5 Se prepara el ADN plásmido pIRES fluorescente mezclando 1 mg/ml de solución de ADN pIRES en amortiguador de carbonato 0.1M, pH 9.2 con 100 μl de 1 mg/ml de una suspensión de DTAF en 10 mM de amortiguador de carbonato, pH 9.2. Después de la incubación durante la noche a 37 grados Celsius, se agrega 200 μl de Tris-HCl 1M, pH 8.3 y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agregan 100 μl de NaCl 1M y 3 ml de etanol al ADN para precipitar el etanol. Después del almacenaje a -20 grados Celsius durante la noche, lo precipitado
10 de etanol se recoleta por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos. Lo precipitado de etano se lava con etanol al 70% hasta que el sobrenadante es claro y se resuspende en 1 ml de TE.

15 Se incuban las suspensiones de YGP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agrega 0.45 ml de etanol al 95% a una serie de tres tubos (YGP, YGP-P, YGP-quitosán), se agrega 0.2 ml de PEI al 2% a dos series de tres tubos y se agrega 0.2 ml de CTAB al 2% a otra serie de tres tubos. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agrega 0.2 ml de CTAB al 2% a una serie de tubos de PEI y la incubación prosigue por 30 minutos adicionales. Se agrega etanol (1 ml, 95%) y los YGP se almacenan durante la noche a -20 grados Celsius. Las suspensiones YGP se lavan con etanol al 70% y se resuspenden en 0.5 ml de PBS.

20 Se colocan en placas macrófagos de murina J774 en placas de seis cavidades a una densidad de 2.5×10^5 células por cavidad y se incuban durante la noche como se describe en el Ejemplo 14. Las transfecciones se realizan como se resume en la Tabla 11. Las partículas se agregan al medio de cultivo a una proporción de 10 partículas por célula y las placas se arremolinan para distribuir las partículas. Las células se incuban durante 4 horas. Al final del periodo de incubación, el medio de cultivo se remueve, las células se lavan con PBS y se fijan en formalina al 0.4% en PBS.

25

Tabla 11							
Tubo	pIRES $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	vol μl	YGP mg	PEI al 2% en TE	Quitosán al 2% en amortiguador de Acetato, pH 5.5	CTAB al 2%	Etanol
1	-	-	1	200 μl	-	200 μl	800 μl
2	-	-	1	-	200 μl	200 μl	800 μl
3	1.8	4	1	200 μl	-	200 μl	800 μl
4	1.8	4	1	-	200 μl	200 μl	800 μl

30

35

40 Se evalúan péptidos que contienen ADN fluorescente y células J774 incubadas con partículas que contienen ADN fluorescente por microscopio fluorescente, y los resultados se resumen en la Tabla 12 y se muestran en las Figuras 3A y 3B.

45

50

55

60

65

Tabla 12			
Tipo de Partícula	Tratamiento	Color de Pelotilla	Examen de Partículas con Microscopio
YGP	etanol	Blanco	Sin fluorescencia
YGP-CN	etanol	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-P	etanol	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP	PEI al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-CN	PEI al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-P	PEI al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP	CTAB al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-CN	CTAB al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-P	CTAB al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarillo intracelular	Figuras 3A y 3B; Partículas muy fluorescentes
YGP-CN	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares
YGP-P	PEI al 2%/CTAB al 2%	Amarillo	Partículas fluorescentes intracelulares

ES 2 355 916 T3

La figura 3 es una imagen a escala de gris (negativo) de contraste invertido de una fotomicrografía de color brillante de células expuestas a partículas YGP cargadas con plásmido pIRES etiquetado fluorescente con PEI como el polímero de captura catiónico y CTAB como un detergente catiónico que indica una célula 310. La figura 38 es una imagen a escala de gris (negativo) de contraste invertido de una fotomicrografía de color fluorescente del mismo campo de células que muestra teñido brillante que representan partículas YGP fluorescentes que contienen ADN plásmido fluorescente internalizado por la misma célula 310 indicada en la Figura 3B.

Ejemplo 19

Expresión de EGFP Por Macrófagos Murinos J774 Incubados con YGP:pIRES

El ADN plásmido de pIRES no fue fluorescentemente etiquetado en este Ejemplo, preferentemente, la expresión funcional de la proteína fluorescente verde (GFP) codificada por pIRES se usa como una demostración de la absorción de partículas de la pared celular de levadura cargadas, liberación intracelular de ADN de pIRES y expresión del GFP como se evidencia por la producción de fluorescencia.

Las formulaciones de YGP: pIRES se prepararon como se resume en la Tabla 12, abajo. Se prepara ADN a partir de diluciones de agua desionizada de 1 mg/ml de solución base. La cantidad indicada de solución de ADN se agrega a YGP y se incuba por al menos 30 minutos para permitir la absorción de líquido. La cantidad indicada de 0.2% de PEI en TE o 0.2% de quitosán en amortiguador de acetato se agrega y la mezcla se deja incubar por 5 minutos antes de la sonicación para producir partículas únicas. Después de una incubación adicional de al menos 30 minutos, se agrega la cantidad indicada de 2% de CTAB. Después de 5 minutos adicionales de incubación, los tubos se sometieron a vórtices mezclados e incubados nuevamente por al menos 30 minutos. Se agrega la cantidad indicada de 95% de etanol. Cada tubo entonces se mezcla y almacena a -20°C durante la noche. Las partículas formuladas de YGP:pIRES entonces se centrifugan, se lavan dos veces en 70% de etanol, se recolectan por filtración a 10,000 rpm por 5 minutos, resuspenden en 0.5 ml de PBS estéril y se someten a sonicación para producir partículas únicas. El número de partículas por ml se contó y cada formulación está y almacena a -20°C.

Se plaquearon macrófagos murino J774 en placas de 6 cavidades a una densidad de 2.5×10^5 células por cavidad y se incuban durante la noche como se describe en el Ejemplo 14. Las transfecciones se realizan como se resume en la Tabla 11, anterior. Las partículas se agregan al medio de cultivo a una relación de 10 partículas por célula y las placas son revueltas para distribuir las partículas. Las células se alimentaron diariamente e incubaron por 2 días. Al final del periodo de incubación, el medio de cultivo se removió, las células se lavaron con PBS y se fijaron en 0.4% de formalina en PBS.

Los resultados son resumidos en la Tabla 13 y se muestran en las Figuras 4A-C. Las células se examinaron usando microscopio de fluorescencia. Noventa y nueve por ciento de células J774 toman partículas YGP-F (Tabla 13, cavidad 1B, Figura 4A). La expresión de EGFP fue evidente en >80% de células J774 como fluorescencia punteada en vacuolas en las cavidades 1E (Figura 4B) y 1F (Figura 4C).

Tabla 13				
Cavid	Descripción	YGP/Célula	volumen	Apariencia
1A	Sin control de tratamiento	0	-	partículas fluorescente de GFP no detectables
1B	Control de Absorción de Partícula de YGPF	10	10 μ l 1/10	Figura 4A, que muestra fagocitosis de partículas de YGFP fluorescentes
1C	Control de PEI/CTAB vacío de YGP	10	11 μ l 1/10	partículas fluorescente de GFP no detectables
1D	Control de Quitosán/CTAB vacío de YGP	10	5 μ l 1/10	partículas fluorescente de GFP no detectables
1 E	PEI/CTAB de pIRES de YGP	10	10 μ l 1/10	Figura 4B, que muestra expresión de GFP fluorescente en células
1F	Quitosán/CTAB de pIRES de YGP	10	6.5 μ l 1/10	Figura 4C, que muestra expresión de GFP fluorescente en células

La Figura 4A es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 410, expuesta a partículas YGP etiquetadas fluorescentes, la Figura 4B es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 420, que expresa GFP de ADN de pIRES suministrada por YGP con una polietilenimina de polímero de captura catiónico (PEI) y una hexadeciltrimetilamonibromuro detergente catiónico (también conocida como cetiltrimetilamonibromuro o CTAB) y la Figura 4C es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color de células, por ejemplo, una célula indicada 430, que expresa GFP de ADN de pIRES suministrada por YGP con un quitosán de polímero de captura catiónico y CTAB detergente catiónico.

Ejemplo 20

Suministro de ADN Fluorescente, Oligonucleótido y Oligonucleótido de siARN en Células J774 Usando Tecnología de Polímero de Captura de Cation-YGP

Se usaron los siguientes materiales: partículas de YGP:ADN de esperma de salmón fluorescente:PEI:CTAB, partículas de YGP:Oligonucleótido fluorescente:PEI:CTAB, y YGP:siARN fluorescente:PEI:CTAB. El oligonucleótido fluorescente fue un 18 mer sintetizado por Sigma Genosys con un residuo de fluoresceína unido al extremo 5':

5' Fluoresceína-TTGGTCATCCATGGCTCT 3' SEC ID NO:1.

El siARN fluorescente fue un siARN de control no silente de 21 mer sintetizado con un residuo de fluoresceína unido al extremo 5' (Qiagen, Valencia, CA, Catálogo No. 1022079):

5' Fluoresceína-UUCUCCGAACGUGUCACGudTdT 3' SEC ID NO:2.

Se plaquearon macrófagos murino J774 en placas de 6 cavidades a una densidad de 2.5×10^5 células por cavidad e incubaron durante la noche como se describe en el Ejemplo 14. Se realizaron transfecciones como se resume en la Tabla 14. Se agregan partículas cargadas de polinucleótido y control al medio de cultivo y las placas se revuelven para distribuir las partículas. Las células se alimentan diariamente e incuban por 24 horas. Al final del periodo de incubación, el medio de cultivo se removió y las células se lavaron con PBS y fijaron en 0.4% de formalina en PBS.

Cavidad	Células	Relación YGP/Célula	Partículas
1A	J774	0	-
1 B	J774	10	YGPF
1C	J774	10	YGP DNAF
1D	J774	10	YGP oligoF
1 E	J774	10	YGP RNAiF

Los resultados se ilustran en las Figuras 5A-I. Se examinaron células usando microscopio de fluorescencia y FACS. 92% de células J774 tomaron partículas YGP-F (Tabla 14, cavidad 1B, Figura 5A). El suministro de oligonucleótido fluorescente (SEC ID NO:1) fue evidente en >80% de células J774 como fluorescencia endosomal punteada y fluorescencia citoplásmica difusa. El suministro de siARN no silente fluorescente (SEC ID NO:1) fue evidente en >80% de células J774 como fluorescencia endosomal punteada y fluorescencia citoplásmica difusa.

La Figura 5A es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente y de luz combinada a color de células, por ejemplo, una célula indicada 510, expuesta a partículas YGP etiquetadas fluorescentes; la Figura 5B es una representación gráfica de los resultados de un estudio de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que muestra un pico mayor 520 que representa la distribución de señales de células

ES 2 355 916 T3

que tiene partículas YGP internalizadas etiquetadas fluorescentes y un pico menor 530 que representa la distribución de señales de células sin partículas YGP etiquetadas fluorescentes; la Figura 5C es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 540, expuesta a partículas de YGP que contienen ADN etiquetado fluorescente, un polímero PEI de captura catiónico y CTAB detergente catiónico; la Figura 5D es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 540, la Figura 5E es una representación gráfica de los resultados de un estudio FACS que muestra un pico mayor 610 que representa la distribución de señales de células que tienen partículas de YGP internalizadas con carga útil de ADN fluorescente y un soporte 620 que representa la distribución de señales de células sin partículas de YGP; la Figura 5F es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 710, incubada con partículas de YGP que contienen ARN antisentido etiquetado fluorescente, PEI y CTAB; la Figura 5G es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 710 que contiene partículas de YGP internalizadas con carga útil de ARN antisentido fluorescente; la Figura 5H es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una micrografía de luz a color de células, por ejemplo, una célula indicada 810, incubada con partículas de YGP que contiene siARN etiquetado fluorescente, PEI y CTAB y la Figura 5I es una imagen a escala de grises de contraste inverso (negativa) de una fotomicrografía fluorescente a color del mismo campo de células que muestra la misma célula indicada 810 que contiene partículas de YGP internalizadas con carga útil de ARNi fluorescente.

En resumen, las cargas útiles de ADN fluorescente, oligonucleótido o siARN cargadas en YGP usando un polímero de captura catiónico eficientemente suministra la carga útil en células J774. Las cargas útiles son liberadas del compartimiento endosomal dentro de 24 horas en el citoplasma y compartimientos nucleares.

REIVINDICACIONES

5 1. Sistema de suministro de partícula, **caracterizado** porque comprende una pared celular de levadura extraída que comprende menos del 90 por ciento en peso de beta-glucano y una molécula de captura de carga útil que es un polímero.

10 2. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque además comprende una molécula de carga útil, en donde la molécula de carga útil y la molécula de captura de carga útil son solubles en el mismo sistema solvente.

3. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado** porque el sistema solvente comprende agua.

15 4. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la pared celular de levadura extraída además comprende más del 50 por ciento en peso de quitina, más del 30 por ciento en peso de manano y/o más del 1 por ciento en peso de proteína.

20 5. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la molécula de captura de carga útil se selecciona del grupo que consiste de:

(i) un polisacárido seleccionado del grupo que consiste de agarosa, un alginato, un xantano, un dextrano, un quitosán, una goma de galactomanano, un derivado de los mismos y una mezcla de los mismos;

25 (ii) poliacrilamida;

(iii) poliamida; y

30 (iv) un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un polímero catiónico, un polímero aniónico, un detergente catiónico, un detergente aniónico y una mezcla de los mismos.

6. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el polímero catiónico se selecciona del grupo que consiste de quitosán, polietilenimina y poli-L-lisina.

35 7. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 5, **caracterizado** porque la molécula de captura de carga útil es una mezcla de un polímero catiónico y un detergente catiónico.

40 8. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el polímero catiónico se selecciona del grupo que consiste de una proteína, un polipéptido, un péptido sintético corto, un péptido anfífilo helicoidal, dendrímeros catiónicos, polímero de glucaramida, oligómero de glicina N-sustituido, poli(ácido 2-metil-acrílico 2-[(2-dimetilamino)-etil]-metil-amino)-etil éster), poli(2-dimetilamino etil)-metacrilato y mezclas de los mismos.

45 9. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el polímero aniónico se selecciona del grupo que consiste de alginato y xantano.

10. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 5, **caracterizado** porque el detergente catiónico es hexadeciltrimetilamonibromuro.

50 11. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la molécula de captura de carga útil se selecciona del grupo que consiste de un polielectrolito catiónico, un polielectrolito aniónico y un polielectrolito anfotérico.

55 12. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 11, **caracterizado** porque el polielectrolito catiónico se selecciona del grupo que consiste de un copolímero de vinil pirrolidona y metil metacrilato cuaternario, una poliacrilamida sustituida, polietilenimina, polipropilenimina, un homopolímero de poliamina, un copolímero de poliamina, cloruro de polidialil dimetil amonio, dextranos sustituidos; goma de guar modificada, una proteína sustituida, un ácido de poliamino, espermina y espermidina.

60 13. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 11, **caracterizado** porque el polielectrolito aniónico se selecciona del grupo que consiste de un copolímero de metil vinil éter y anhídrido maleico, un copolímero de metil vinil éter y ácido maleico, ácido algínico, una carboximetil celulosa, una poliacrilamida sustituida, un ácido poliacrílico, un ácido de poliestiren sulfónico, un sulohato de dextrano, un sacárido sustituido, heparina y sales farmacéuticamente aceptables.

65 14. Sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 2, **caracterizado** la molécula de carga útil se selecciona del grupo que consiste de un polinucleótido, un péptido, una proteína, un agente activo orgánico pequeño, un agente activo inorgánico pequeño y una mezcla del mismo.

ES 2 355 916 T3

5 crecimiento, integrina, proteína A, proteína D, factor reumatoide, factor neurotrófico, factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4, neurotrofina-5, o neurotrofina-6, NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF); factor de crecimiento del fibroblasto alfa, factor de crecimiento del fibroblasto beta, factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento alfa de transformación, factor de crecimiento beta 1 de transformación, factor de crecimiento beta 2 de transformación, factor de crecimiento beta 3 de transformación, factor de crecimiento beta 4 de transformación, factor de crecimiento beta 5 de transformación, factor de crecimiento I similar a insulina, factor de crecimiento II similar a insulina, factor de crecimiento I similar a insulina des(1-3), factor de crecimiento similar a insulina unido a la proteína, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, factor osteoinductivo, inmunotoxina, proteína morfogenética ósea, receptor de célula T, proteínas de membrana de superficie, factor acelerador de decadencia, antígeno viral, proteína de transporte, receptor homing, adhesina, proteína reguladora, inmunoadesina, anticuerpos y fragmentos o variantes de los mismos biológicamente activos.

15 23. El sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 14, **caracterizado** porque el agente activo orgánico pequeño se selecciona del grupo que consiste de

(i) un oligómero de poliamidas heterocíclicas que se unen a la ranura menor de ADN de doble hebra en una manera específica de la secuencia;

20 (ii) un oligómero que tiene subunidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste de N-metilimidazol-carboxamida, N-metilpirrolcarboxamida, beta-alanina y dimetilaminopropilamida;

25 (iii) un agente anticonceptivo, un agente terapéutico gastrointestinal, un agente antifertilidad no esteroideo, un agente parasimpatomimético, un agente psicoterapéutico, un tranquilizante mayor, un tranquilizante menor, un descongestionante rinológico, un sedativo-hipnótico, un esteroide, una sulfonamida, una vacuna; una vitamina, un nutriente, un antimalarial, un agente anti-migraña, un agente anti-Parkinson, un anti-espasmódico, un agente anticolinérgico, un antitusivo, un broncodilatador, un agente cardiovascular; un agente anti-hipertensivo, un vasodilatador coronario, un nitrato orgánico, un alcaloide, un analgésico, un narcótico, un agente anti-cancerígeno, un anti-convulsionante, un anti-emético, un agente anti-inflamatorio, un fármaco citotóxico o un antibiótico; y

30 (iv) un antibiótico seleccionado a partir del grupo que consiste de una cefalosporina, cloranfenicol, gentamicina, canamicina A, canamicina B, una penicilina, ampicilina, estreptomycin A, antimicina A, cloropantenol, metronidazol, oxitetraciclina, penicilina G, una tetraciclina y mezclas de los mismos.

35 24. Un artículo de manufactura **caracterizado** porque comprende un primer contenedor que comprende una molécula de carga útil seleccionada del grupo que consiste de una composición de ácido nucleico, composición de proteína, molécula orgánica pequeña y mezclas de las mismas, un segundo contenedor que contiene el sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1 e instrucciones de uso.

40 25. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende el sistema de suministro de partícula de conformidad con la reivindicación 1, una molécula de carga útil seleccionada a partir del grupo que consiste de un polinucleótido, una proteína, una molécula orgánica pequeña y mezclas de los mismos, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

45 26. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende el sistema de suministro de partícula de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

50 27. El sistema de suministro de partícula de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 para uso en medicina.

55 28. Un método para elaborar un sistema de suministro de partícula **caracterizado** porque comprende las etapas de proporcionar una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, la pared celular de levadura que define un espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de carga útil en donde la molécula de carga útil llega a estar asociada con la pared celular de levadura extraída; y poner en contacto la pared celular de levadura extraída con una molécula de captura de carga útil en donde la molécula de captura de carga útil estabiliza la asociación de la molécula de carga útil y la pared celular de levadura extraída para formar un sistema de suministro de partícula y en donde la molécula de captura de carga útil es un polímero.

60 29. El método de conformidad con la reivindicación 28, **caracterizado** porque además comprende las etapas de lavar y secar el sistema de suministro de partícula.

30. El método de conformidad con la reivindicación 28, **caracterizado** porque la molécula de carga útil está al menos parcialmente dentro del espacio interno definido por la pared celular de levadura.

65 31. El método de conformidad con la reivindicación 28, **caracterizado** porque la estabilización de la asociación de la molécula de carga útil ocurre al menos parcialmente dentro del espacio interno definido por la pared celular de levadura.

ES 2 355 916 T3

32. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, **caracterizado** porque el sistema de suministro de partícula es un sistema de suministro de partícula de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

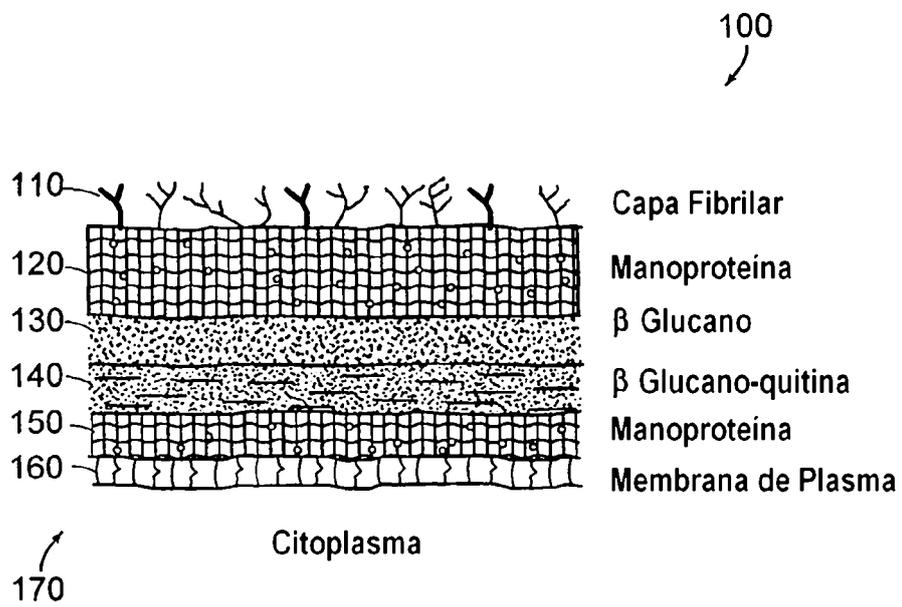


FIG. 1

Partícula de Pared Celular de Levadura

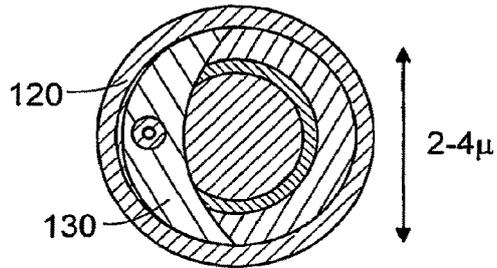


FIG. 2A



FIG. 2B

Beta Glucano de YGMP

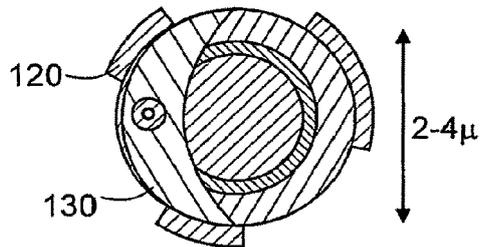


FIG. 2C

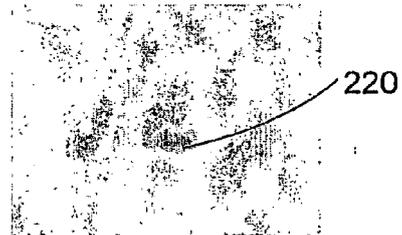


FIG. 2D

Beta Glucano de YGP

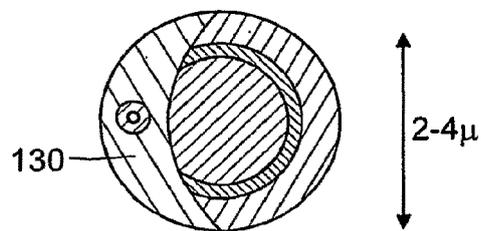


FIG. 2E



FIG. 2F

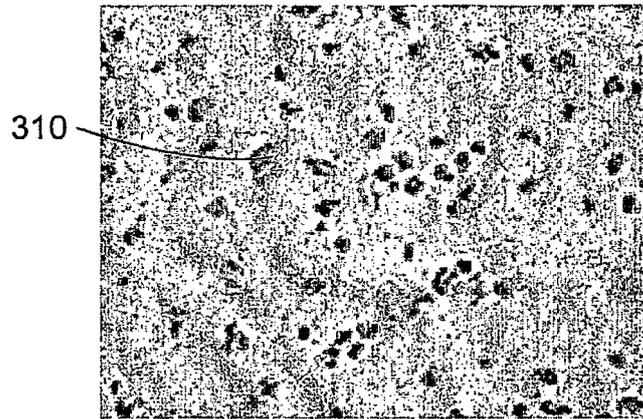


FIG. 3A

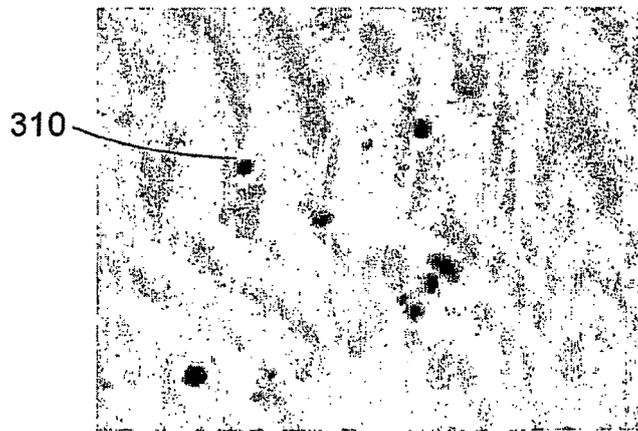


FIG. 3B

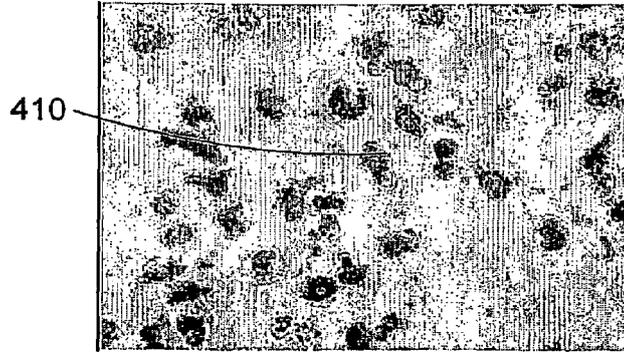


FIG. 4A

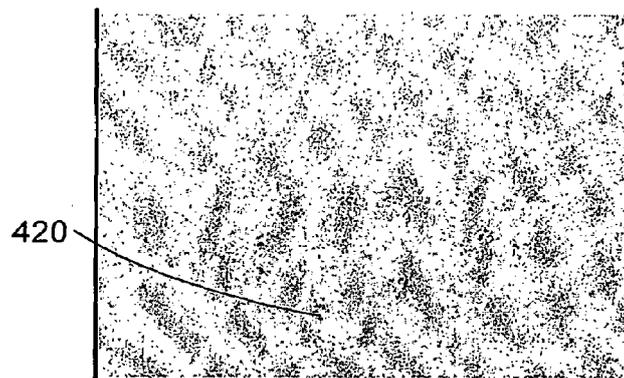


FIG. 4B

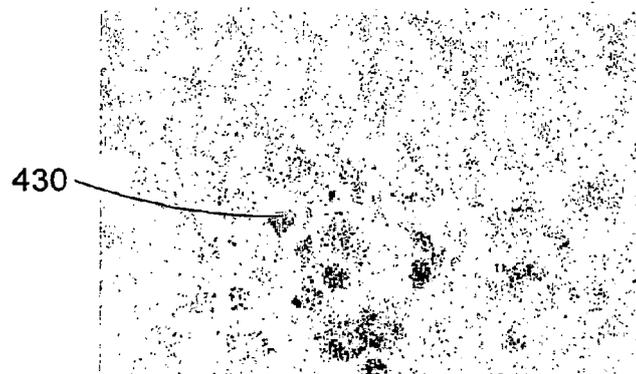


FIG. 4C

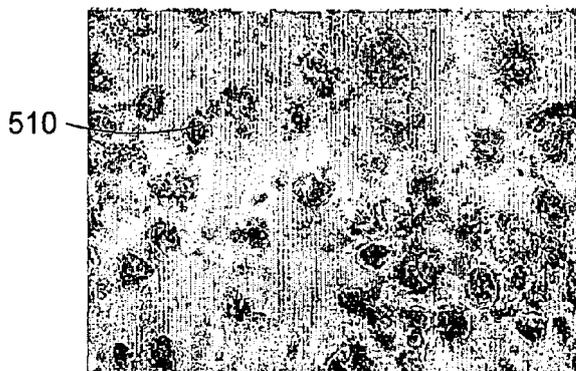


FIG. 5A

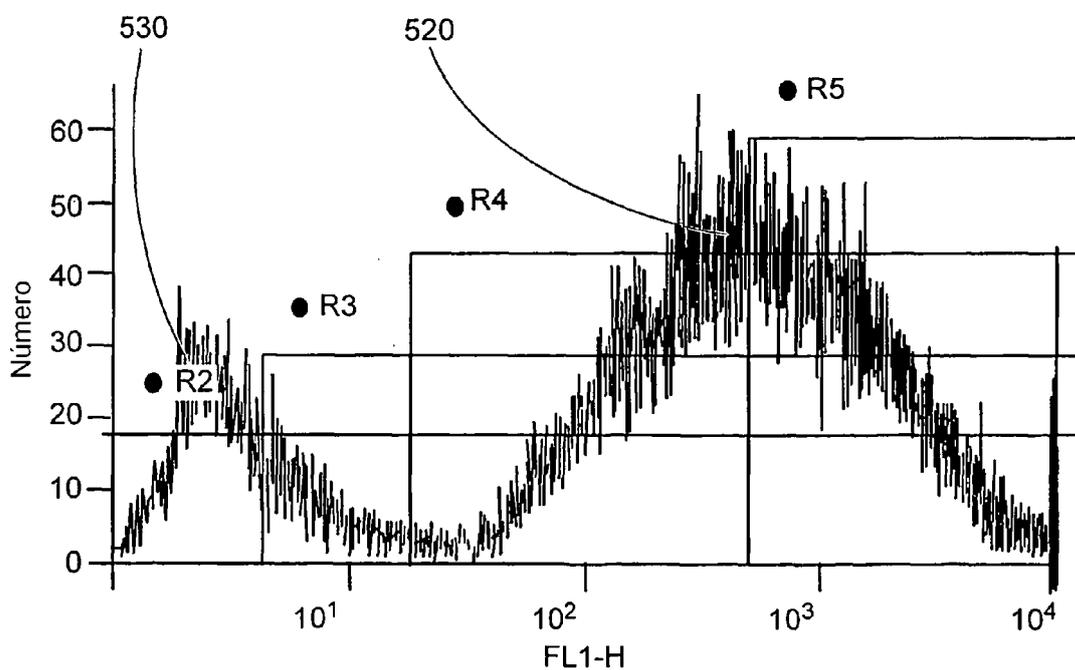


FIG. 5B

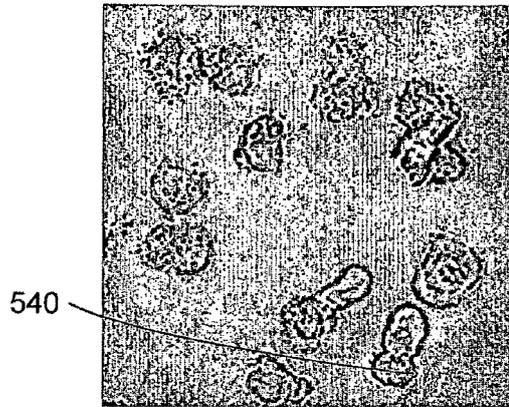


FIG. 5C

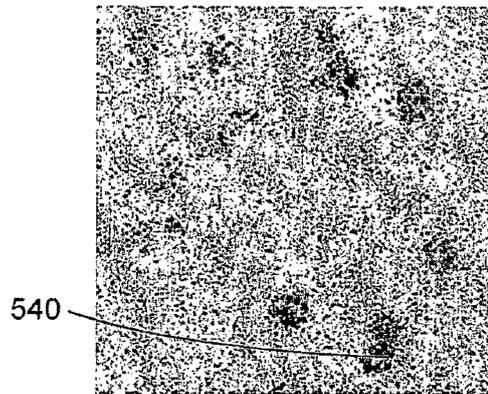


FIG. 5D

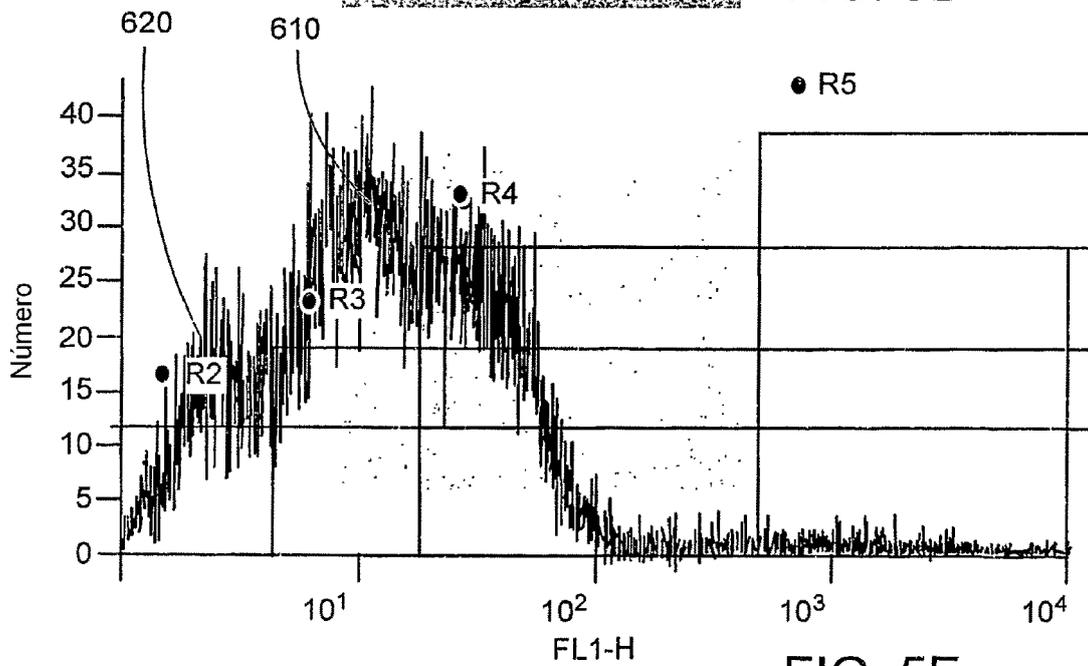


FIG. 5E

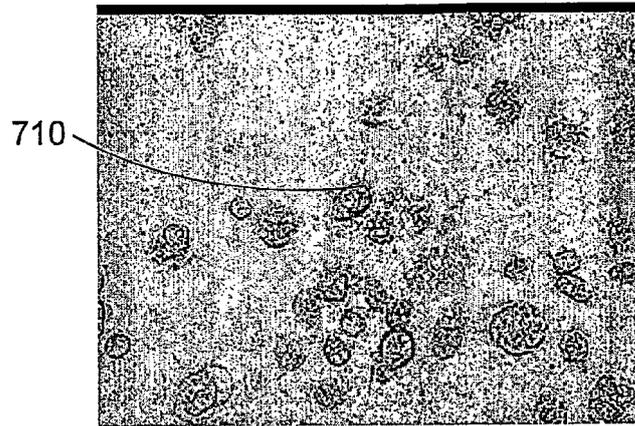


FIG. 5F

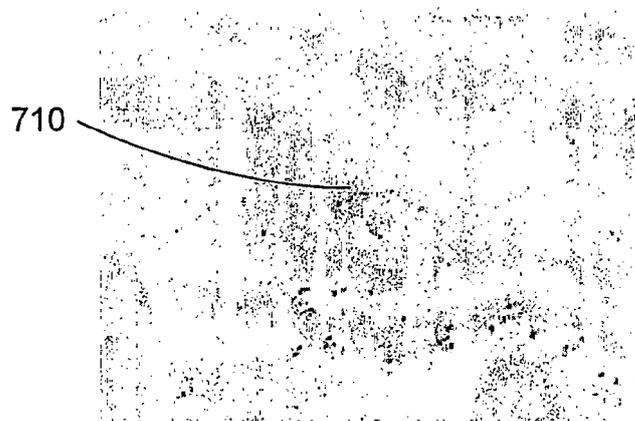


FIG. 5G

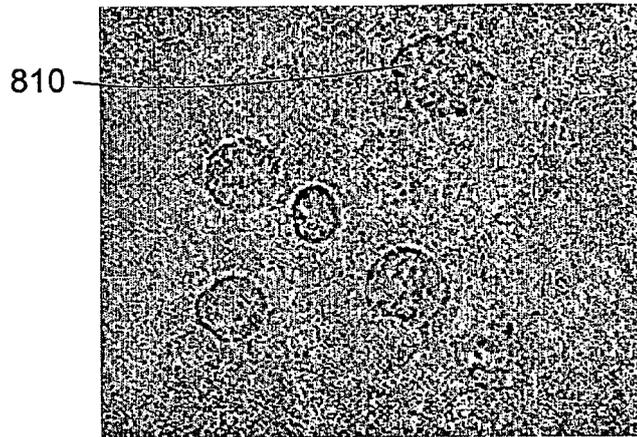


FIG. 5H

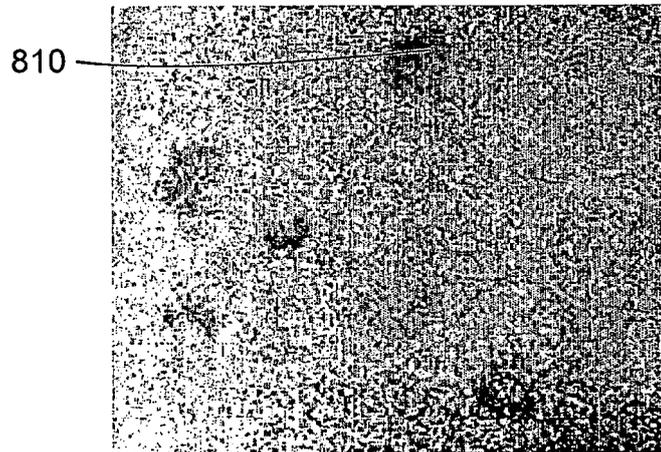


FIG. 5I